HERABSETZUNG DES NUKLEINSÄURE-GEHALTES DURCH HITZEBEHANDLUNG BEI HYDROGENOMONAS EUTROPHA H 16

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Abdulla Abu Ruwaida
aus Beer-Scheba (Palästina)

Göttingen 1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534921_0059

Fotodruck: ANDREAS FUNKE, Offsetdruck
34 Göttingen · Wendenstraße 5b

HERABSETZUNG DES NUKLEINSÄURE-GEHALTES DURCH HITZEBEHANDLUNG BEI HYDROGENOMONAS EUTROPHA H 16

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Abdulla Abu Ruwaida
aus Beer-Scheba (Palästina)

Göttingen 1974

Diese Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen durchgeführt.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. H. G. Schlegel

Korreferent: Prof. Dr. A. Pirson

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Juli 1974

Meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. H. G. Schlegel möchte ich für die Aufnahme an seinem Institut, die Anregung zu dieser Arbeit, für sein reges Interesse an ihrem Fortgang und für die mir jederzeit gewährte Unterstützung meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. R. M. Lafferty, Dr. R. Brinkmann und meinen Kollegen, für die zahlreichen Hinweise und die freundliche Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit.

An dieser Stelle möchte ich all denen meinen besonderen Dank aussprechen, die Zivilcourage gezeigt und mir Unterstützung und Beistand geleistet haben, so daß es mir möglich war, diese Arbeit anzufertigen.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst schulde ich für die Gewährung der finanziellen Unterstützung herzlichen Dank.

Darüber hinaus danke ich allen, die mir bei der Anfertigung meiner Arbeit in irgendeiner Weise behilflich waren.

ABKÜRZUNGEN

DC	=	Dünnschicht-Chromatographie
DNase	=	Desoxyribonuklease
DNS	=	Desoxyribonukleinsäure
DPA	=	Diphenylamin
(E)	=	Einheit
EZP	=	Einzellerprotein
Malat-DH	=	Malat-Dehydrogenase
$NAD(H_2)$	=	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (rediziert)
NS	=	Nukleinsäure
O.D.	=	Optische Dichte
PCS	=	Perchlorsäure
PEI	=	Polyäthylenimin
PHB	=	Poly-B-Hydroxybuttersäure
RNase	=	Ribonuklease
RNS	=	Ribonukleinsäure
TG	=	Trockengewicht
TMK	=	Tris-HCl-, Mg. Acetat-, KCl-Puffer
Tris	=	Tris (Hydroxymethyl) aminomethan
ZS	=	Zellsuspension
ADP	=	Adenosin-Di-Phosphat
GDP	=	Guanosin-Di-Phosphat
CDP	=	Cytidin-Di-Phosphat
UDP	=	Uridin-Di-Phosphat
AMP	=	Adenosin-Mono-Phosphat
GMP	=	Guanosin-Mono-Phosphat
CMP	=	Cytidin-Mono-Phosphat
UMP	=	Uridin-Mono-Phosphat
ATP	=	Adenosin-Tri-Phosphat
GTP	=	Guanosin-Tri-Phosphat
CTP	=	Cytidin-Tri-Phosphat
UTP	=	Uridin-Tri-Phosphat

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	4
1.	Organismen	4
2.	Nährlösungen und Kulturverfahren	4
3.	Trübungsmessung	5
4.	Nukleinsäure (RNS und DNS)-Bestimmung	5
	I. Bestimmungsmethoden	5
	A. RNS-Bestimmung	5
	B. DNS-Bestimmung	5
	II. Extraktion der Nukleinsäuren (RNS und DNS) aus Hydrogenomonas-Zellen	7
	III. Ermittlung von RNS in Hydrogenomonas-Zellen	8
5.	Proteinbestimmung	9
5.1.	Proteinbestimmung von Zellsuspensionen; nach Schmidt et al., 1963	9
5.2.	Proteinbestimmung in zellfreien Extrakten; nach Bleisenherz et al., 1953	9
6.	Trockengewichtbestimmung	10
6.1.	TG in Zentrifugenröhrchen-Methode	10
6.2.	TG Bestimmung, Membran-Filter-Methode	11
7.	Bestimmung der Enzymaktivitäten	11
7.1.	Enzymindikatoren	11
	a. Malat-Dehydrogenase	12
	b. NADH-Oxydase	12
7.2.	Enzymaktivität der Nukleasen	13
7.2.1.	RNase-Enzymtest	13
7.2.2.	DNase-Enzymtest	14
7.2.3.	Alkalische Phosphatase-Enzymtest	14
7.2.4.	Phosphodiesterase-Enzymtest	15

Seite

8. Gewinnung von zellfreien Extrakten 15

9. Rohextrakt-Entsalzen durch Sephadex G-25 16

10. Entsalzen von freigesetzten RNS-Abbauprodukten 17

11. Dünnschicht-Chromatographie 17

12. Chemikalien 18

III. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE 20

1. Wachstum und Ernte 20

1.1.1. Wachstum des Wildtyps und PHB-freien Mutante unter normalen Wachstumsbedingungen 20

1.1.2. Ernte 22

1.2. Wachstum des Stammes $PHB^{-}4$ unter Mangelbedingungen 22

2. Herabsetzung des Nukleinsäure-Gehaltes im EZP-Produkt aus Hydrogenomonas-Zellen 25

2.1. Ermittlung der optimalen Bedingungen der Hitzebehandlung 27

2.1.1. Optimierung von Zeit und Temperatur der Hitzeschockbehandlung 27

2.1.2. Optimierung von Zeit und Temperatur der Hitzenachinkubation 30

2.2. Auswirkung der Hitzebehandlung auf die Zellbestandteile Protein RNS und DNS 32

2.2.1. Auswirkungen auf den Proteingehalt 34

2.2.2. Auswirkungen auf den Nukleinsäuregehalt (RNS und DNS) 34

3. Enzymaktivität der Nukleasen bei $PHB^{-}4$-Bakterien 38

3.1. Optimierung der enzymatischen Testbedingungen der Nukleasen 38

Seite

3.1.1. Optimierung der enzymatischen Testbedingungen für RNase 39
3.1.1.1. Zeitabhängigkeit der RNase-Reaktion im Enzymtest 40
3.1.1.2. Abhängigkeit von der eingesetzten Rohextraktmenge 40
3.1.1.3. Ermittlung des pH-Optimums im Enzymtest 42
3.1.1.4. Temperatur-Optima der RNase-Aktivität 42
3.1.1.5. Ermittlung der geeigneten Pufferlösung für den Testansatz der RNase 42
3.1.1.6. Einfluß einiger einwertiger bzw. zweiwertiger Salz-Ionen auf die RNase-Aktivität 45
3.1.2. Optimierung der enzymatischen Testbedingungen für Alkalische Phosphatase 48
3.1.2.1. Zeitabhängigkeit der Reaktion der Alkalischen Phosphatase 49
3.1.2.2. Abhängigkeit von der Extraktmenge 49
3.1.3. Optimierung der enzymatischen Testbedingungen für Phosphodiesterase 51
3.1.3.1. Zeitabhängigkeit der Reaktion der Phosphodiesterase 51
3.1.3.2. Abhängigkeit von der eingesetzten Extraktmenge 51
3.1.4. Optimierung der enzymatischen Testbedingungen für DNase 53
3.1.4.1. Zeitabhängigkeit der DNase-Reaktion im Enzymtest 53
3.1.4.2. Abhängigkeit von der eingesetzten Extraktmenge 53
3.1.4.3. Ermittlung des pH-Optimums im Enzymtest 55
3.1.4.4. Temperatur-Optimum der DNase-Aktivität 55
3.1.4.5. Ermittlung der geeigneten Pufferlösung für den Testansatz der DNase 56
3.1.4.6. Einfluß einiger einwertiger bzw. zweiwertiger Salz-Ionen auf die DNase-Aktivität 56

3.2. Veränderung der Nukleaseaktivität während der Hitzebehandlung 58

		Seite
3.2.1.	Veränderung der RNase-Aktivität	60
3.2.2.	Veränderung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase	63
3.2.3.	Veränderung der Aktivität der Phosphodiesterase	63
3.2.4.	Veränderung der Aktivität der DNase	63
3.3.	Auswirkung der Hitzebehandlung auf den RNS-DNS-Gehalt der Zellen des Stammes $PHB^{-}4$	66
3.3.1.	Auswirkung der Hitzebehandlung auf den RNS-Gehalt	66
3.3.2.	Auswirkung der Hitzebehandlung auf den DNS-Gehalt	68
4.	Lokalisation der Nukleasen in Zellmaterial	69
4.1.	Lokalisation der Aktivität der Indikatorenzyme Malat-Dehydrogenase und NADH-Oxydase	72
4.2.	Lokalisation der Aktivität der Nukleasen	75
4.2.1.	Lokalisation der RNase-Aktivität	75
4.2.2.	Lokalisation der DNase-Aktivität	79
4.2.3.	Lokalisation der Aktivität der Alkalischen Phosphatase	79
4.2.4.	Lokalisation der Aktivität der Phosphodiesterase	82
5.	Charakterisierung der Nukleinsäure-Abbauprodukte durch Dünnschicht-Chromatographie	82
IV.	DISKUSSION	87
V.	ZUSAMMENFASSUNG	107
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	110

I. EINLEITUNG

Der Gehalt von Mikroorganismen an Nucleinsäuren ist im allgemeinen um ein Mehrfaches höher als in Säugetiergeweben. So betragen die Relationen Nucleinsäure: Protein: Trockengewicht nach überschlägigen Berechnungen beim Weizen 0.1 : 10 : 100 (LANG und SCHAEFFNER, 1963; SCHORMUELLER, 1965; NEHRING, 1972), beim Rindermuskel 4.2 : 60 : 100 (LANG und SCHAEFFNER, 1963; SOUCI et al., 1962), bei Hefe 10 : 50 : 100 (REIFF et al., 1962; MATELES und TANNENBAUM, 1968; KIHLBERG, 1972) und bei Bakterien 27.3 : 54.6 : 100 (DIJK-SALKINOJA und PLANTA, 1971).

Aus der Tatsache, daß nicht der DNS-, sondern der RNS-Gehalt außerordentlich hoch ist, läßt sich bereits auf einen Zusammenhang zwischen Wachstumsrate und Proteinsynthese schließen. Nimmt man an, daß die Geschwindigkeit der Proteinsynthese am Ribosom bei den Organismen etwa gleich und begrenzt ist, so läßt sich eine erhöhte Rate der Proteinsynthese nur durch eine entsprechend vermehrte Zahl von Ribosomen erreichen. Die bekanntermaßen hohe Wachstumsrate vieler Bakterien ist demnach an einen hohen Gehalt an Ribosomen gebunden. Man kann nicht erwarten, daß sich dieser RNS-Gehalt durch Veränderung der Milieufaktoren oder durch Eingriffe in den genetischen Bestand der Zelle verändern läßt, ohne gleichzeitig die Wachstumsrate zu verändern.

Die hohe Wachstumsrate ist eine der Eigenschaften, derentwegen man in den Mikroorganismen eine potentielle Quelle von Futter- und Nahrungseiweißen für die Zukunft sieht. Mikroorganismen lassen sich in industriellem Maßstab mit verschiedenen unkonventionellen Substraten in großen Mengen heranziehen. In allen Fällen stellt sich das gleiche Problem: Bei hohen Wachstumsraten ist der Nucleinsäuregehalt sehr hoch und übersteigt den der herkömmlichen Eiweißquellen um ein Mehrfaches.

Die mechanische oder chemische Trennung der beiden Bestandteile Protein und Nucleinsäure ist aufwendig. Bei beiden Substan-

zen handelt es sich um Biopolymere. Erleichtert würde die Trennung, wenn die zu entfernende Komponente hydrolysiert und somit in Form der Monomeren durch Dialyse entfernt werden könnte. Erfolgt die Hydrolyse enzymatisch in den Zellen, so könnten die natürlichen Zellgrenzschichten als Dialysenmembran dienen. Zur Induktion der intracellulären Nucleasen bieten sich mehrere Verfahren an: Strahleneinwirkung, Trocknung, Behandlung mit chemischen Reagenzien und Hitzeeinwirkung sowie möglicherweise andere Methoden. Bei Hefe hat sich bereits als günstiges Verfahren eine Hitzebehandlung, bestehend aus kurzfristigem Hitzeschock und Nachbehandlung bewährt (MAUL et al., 1970; OHTA et al., 1971; IMADA et al., 1972a).

Für Bakterien bestanden zu dem Zeitpunkt, als die Experimente zu dieser Arbeit aufgegriffen wurden, keine Erfahrungen bezüglich der Herabsetzung des Nucleinsäuregehalts.

Nachdem bereits seit 40 Jahren auf der Grundlage von Sulfitablaugen gewachsene Hefen als Futtermittel eingesetzt werden und auf Kohlenwasserstoffen gezogene Hefen in großen Mengen hergestellt werden, wird an mehreren Stellen darüber gearbeitet, unkonventionelle Rohstoffe mit Hilfe von Bakterien in Futtereiweiß umzuwandeln. Zu diesen Rohstoffen gehören Kohlenwasserstoffe, organische Säure, Methan, Methanol und Kohlendioxyd und Wasserstoff (GOULD, 1966; MATELES und TANNENBAUM, 1968; SCHLEGEL, 1968, 1969; SCHLEGEL et al., 1969; SCHLEGEL und LAFFERTY, 1971). Das letztgenannte Substrat wird von H_2-Bakterien der Gattung Hydrogenomonas eutropha ökonomisch genutzt und bietet sich zur Produktion von Einzellerprotein an (SCHLEGEL und LAFFERTY, 1971; LAFFERTY et al., 1973).

Die vorliegende Untersuchung hatte zum Ziele, die möglichen Verfahren zur Herabsetzung des Nucleinsäuregehalts zu überprüfen und eine Methode zu entwickeln, zu nucleinsäurearmen

Zellen zu gelangen. Gleichzeitig sollten die regulatorischen Mechanismen, die Lokalisation des Nucleinsäureabbaus und die Abbauprodukte der Nucleinsäuren untersucht werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Organismen

Zu den vorliegenden Untersuchungen wurde Hydrogenomonas eutropha H 16 (WILDE, 1962) und die davon abgeleitete PHB-freie Mutante (PHB^-4; SCHLEGEL et al., 1970) herangezogen.

2. Nährlösungen und Kulturverfahren

Als Grundmedium für die Anzucht von Knallgasbakterien diente das Mineralmedium von SCHLEGEL et al. (1961). Es wurde die Spurenelementlösung SL 4 von PFENNIG und LIPPERT (1966) zugesetzt.

Lösung A:	$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$		9.0 g
	KH_2PO_4		1.5 g
	NH_4Cl		1.0 g
	Spurenelementlösung		1.0 ml
	H_2O bidestilliert	ad	1000 ml
Lösung B:	Fe-NH_4-Citrat		0.1 g
	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$		0.6 g
	$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$		4.0 g
	H_2O bidestilliert		400 ml

Nach getrennter Sterilisation wurden zu 1000 ml der Lösung A 10 ml Lösung B zugesetzt. Bei chemoautotrophem Wachstum wurde dem Medium 0,05% $NaHCO_3$ zugefügt. Die Nährlösung hatte einen pH von 7.0 - 7.2.

Die Zellen wurden in 10 l-Fermentern (BRAUN, Melsungen) auto-

troph mit einem Gasgemisch von 80 - 70% H_2, 10 - 20% O_2 und 10% CO_2 bei einer Temperatur von 31°C gezogen.

3. Trübungsmessung

Die Trübung von Hydrogenomonas-Zellsuspension wurde bei 436 nm in einem ZEISS- oder EPPENDORF-Filterphotometer bei 1 cm Schichtdicke gegen Wasser gemessen. Die Suspension wurde immer so verdünnt, daß die Trübung im Photometer eine Extinktion von 0,3 nicht überschritt.

4. Nukleinsäure (RNS und DNS)-Bestimmung

Die Bestimmung der Nukleinsäuren RNS und DNS wurde nach der von HERBERT et al. (1971) beschriebenen Methode zur Nukleinsäure-Bestimmung in Mikroorganismen ausgeführt:

I. Bestimmungsmethoden

A. RNS-Bestimmung; Orcin-Methode, modifiziert von HERBERT et al. (1971):

a. Reagenzien:

$FeCl_3$-Lösung: 0,9 g $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$ wurden in 1000 ml konzentr. HCl (37%ig) gelöst. Diese Lösung wurde bei -4°C aufbewahrt.

Orcin-Lösung: 1 g Orcin (p.a., MERCK AG) wurde in 1000 ml bidest. H_2O gelöst. Diese Lösung kann nur wenige Wochen (3 - 4) im Dunkeln bei °C stabil bleiben.

Orcin-Reagenz: Erst kurz vor der RNS-Bestimmung wurden

4 Volumina $FeCl_3$-Lösung zu einem Volumen Orcin-Lösung zugefügt. Dieses Reagenzien-Gemisch ist nicht haltbar.

b. Methode:

1 ml Probe (NS-Extrakt u.ä.) wurde in einem zu 15 ml graduierten Reaktionsglas mit Glasstopfen pipettiert, 3 ml frisch angesetztes Orcin-Reagenz wurden zugefügt. Die Proben wurden 20 min in einem siedenden Wasserbad gekocht, dann in Eiswasser abgekühlt. Das Gesamtvolumen der einzelnen Proben wurde auf 15 ml mit n-Butanol aufgefüllt. Im ZEISS-Spectrophotometer wurde die Extinktion bei 672 nm in Glasküvetten mit 1 cm Lichtweg gegen einen Reagenz-Leerwert gemessen. Der RNS-Gehalt wurde aus einer mit RNS-Präparat (aus Hefe) aufgenommenen Eichkurve abgelesen und ausgerechnet.

B. DNS-Bestimmung: nach der von BURTON (1956) beschriebenen und von HERBERT et al. (1971) modifizierten Diphenylamin(DPA)-Methode.

a. Reagenzien

DPA-Lösung: 1,5 g Diphenylamin (puriss., p.a., FLUKA AG) wurden in 100 ml Essigsäure (96%ig) gelöst und mit 1,5 ml konz. H_2SO_4 versetzt. Diese Lösung wurde im Dunkeln aufbewahrt.

Acetaldehyd-Lösung: 1,6%ige (16 mg/ml) Acetaldehyd-Lösung aus konzentrierter Acetaldehyd-Lösung (99%ig, p.a., MERCK AG).

DPA-Reagenz: Am Tag der Verwendung wurde 0,1 ml 1,6%iger Acetaldehyd zu 20 ml DPA-Lösung zugegeben.

b. Methode:

1 - 2 ml Probe (NS-Extrakt u.ä.) wurden mit 2 ml DPA-Reagenz gut gemischt, über Nacht (16 - 20 Std.) bei 30°C inkubiert. Im ZEISS-Spectrophotometer (PL4) wurde die Extinktion bei 600 nm in Glasküvetten mit 1 cm Lichtweg gegen einen Reagenzien-Leerwert gemessen (Bemerkung: Der Extinktionswert des Reagenzien-Leerwerts gemessen gegen bidest. H_2O durfte den Wert 0,02 - 0,03 nicht überschreiten, sonst mußten die DPA-Reagenzbestandteile (DPA, Essigsäure oder Acetaldehyd) erneut gereinigt werden). Der DNS-Gehalt wurde aus einer mit DNS-Reinpräparat (aus Kalb-Thymus; BDH) aufgenommenen Eichkurve abgelesen und ausgerechnet.

II. Extraktion der Nukleinsäuren (RNS und DNS) aus Hydrogenomonas-Zellen

Während der Nukleinsäure-Extraktion sollte keine NS-Hydrolyse auftreten. Die Extraktion wurde wie folgt ausgeführt:

1. Vorbereitung von Zellen:

   a. Frisch geerntete oder gefriergetrocknete Zellen* wurden einmal mit einer 0,1%igen NaCl-Lösung gewaschen (bei 4000 U/min, 20 min).

   b. Die gewaschenen Zellen wurden zur Entfernung von säure-

---

* Es sollen genügend Zellen vorbereitet werden (z.B. bei einer Zellsuspension, die eine O.D.436 nm von 5 - 10 aufweist, werden 10 ml Zellsuspension aufgenommen); dabei erreicht man gute Resuspendierung der Zellen bei NS-Extraktion und je 1 ml NS-Extrakt beim Ausrechnen entspricht 1 ml aufgenommener Zellsuspension.

löslichen Substanzen in 5 ml kalter 0,25 N Perchlorsäure (PCS) resuspendiert, bei °C im Eiswasser 30 min inkubiert und von Zeit zu Zeit geschüttelt. Am Ende der Inkubation wurde bei 4000 U/min 20 min lang abzentrifugiert.

2. Extraktion der Nukleinsäuren (RNS und DNS) nach der von HERBERT et al. (1971) beschriebenen BURTON-Methode (1956) zur Nukleinsäuren-Extraktion mit 0,5 N PCS bei 70°C.

Die schon vorbereiteten Zellen wurden in 4 ml 0,5 N PCS resuspendiert, für 15 Minuten bei 70°C inkubiert und von Zeit zu Zeit geschüttelt. Nach dem Erkalten wurde bei 4000 U/min für 20 min abzentrifugiert und der Überstand (Ü I) in einem graduierten Reagenzglas aufgehoben. Das Pellet wurde dann zweimal je in 3 ml 0,5 N PCS resuspendiert, für 15 min bei 70°C inkubiert, geschüttelt, abgekühlt und abzentrifugiert. Die überstehenden Ü II und Ü III wurden zum Ü I zugefügt, das Gemisch der Überstehenden (Extrakte; Ü I, Ü II und Ü III) wurde mit 0,5 N PCS auf 10 ml gebracht und als Nukleinsäuren (NS)-Extrakt bezeichnet. Durch diese Methode zur NS-Extraktion konnte >98% der DNS und ca. 100% der RNS aus Hydrogenomonas-Zellen extrahiert werden (siehe Anhang 1.4.).

III. Ermittlung von RNS und DNS in Hydrogenomonas-Zellen

Anhand der Methoden zur RNS- und DNS-Bestimmung und durch Vergleichen bzw. Ausrechnen nach einer Eichkurve mit reinem RNS- und DNS-Präparat konnte der RNS- und DNS-Gehalt im Nukleinsäure-Extrakt aus Hydrogenomonas-Zellen bestimmt werden. Eichkurven für RNS und DNS siehe Anhang (1.1).

5. Proteinbestimmung

5.1. Proteinbestimmung von Zellsuspensionen; nach der von SCHMIDT et al. (1963) modifizierten Methode von LARIVIERE (1958)

Reagenzien:

Lösung A: 16 g NaOH in 100 ml bidest. H_2O

Lösung B:
- 5 g K-Na-Tartrat
- 1 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$
- 2 g KJ
- 4 g NaOH in 400 ml bidest. H_2O

Methode:

2 - 4 ml Zellsuspension (je nach Dichte der ZS) werden abzentrifugiert, zweimal mit 0,1%iger NaCl-Lösung gewaschen, auf 4 ml mit H_2O aufgefüllt. 0,4 ml Lösung A werden zugegeben, für 10 min in einem siedenden Wasserbad inkubiert und sofort abgekühlt. Nach Zugabe von 1,6 ml Lösung B wird das Gemisch 30 min bei 37°C gehalten und anschließend 20 min mit 4000 U/min zentrifugiert. Die Extinktion des Überstehenden wurde im EPPENDORF-Photometer bei 546 nm gegen einen Reagenzien-Leerwert in Glasküvetten mit 2 cm Lichtweg bestimmt. Der Proteingehalt wurde aus einer mit Rinderserumalbumin aufgenommenen Eichkurve abgelesen. Eichkurve siehe Anhang (2.1.).

5.2. Proteinbestimmung in zellfreien Extrakten; Biuret-Methode nach BEISENHERZ et al. (1953)

Biuret-Reagenz:
- 0,2 N NaOH 400 ml
- K-Na-Tartrat 9 g

$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$		3 g
KJ		5 g
0,2 N NaOH	ad	1000 ml

Methode:

In Zentrifugenröhrchen wurden Proben zwischen 0,1 - 0,5 ml (je nach Dicke des Extraktes) mit 0,15 ml 3 M Trichloressigsäure (Proteinfällung) versetzt und mit destilliertem Wasser auf 1,0 ml aufgefüllt. Das ausgefallene Protein wurde 3 min bei 3000 U/min in der CHRIST-Junior II Zentrifuge (Fa. HERAEUS-CHRIST, Osterode) abzentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgegossen und die Zentrifugengläser 5 min mit der Öffnung nach unten auf ein Filterpapier gestellt, um die letzten Wassertropfen zu entfernen. Nach Zugabe von 4,9 ml H_2O und 5 ml Biuret-Reagenz wurde die Lösung gründlich gemischt, und nach halbstündigem Stehen wurde die Extinktion bei 546 nm in dem EPPENDORF-Photometer in Glasküvetten mit 2 cm Lichtweg gegen einen Reagenzien-Leerwert bestimmt. Der Proteingehalt des Ansatzes wurde nach einer Eichkurve mit Rinderserumalbumin verglichen und ausgerechnet. Eichkurve siehe Anhang (2.2.).

6. Trockengewicht-Bestimmung

6.1. TG in Zentrifugenröhrchen-Methode

Das TG einer Suspension konnte bequem in Zentrifugenröhrchen (10 x 1,5 cm) bestimmt werden. Man bestimmt das Leergewicht, zentrifugiert 10 ml ab, gießt das Überstehende ab, pipettiert bei dünnen Suspensionen erneut 10 ml ein, zentrifugiert erneut, gießt ab (es sollten mindestens 10 - 15 mg Zellen zur Wägung gelangen; das Volumen der Suspension richtet sich also nach diesem Mindestgewicht und ist von der Zellsuspensionsdichte abhängig). Die Zellen werden einmal mit 0,9%iger NaCl-Lösung ausgewaschen, nach Entfernen des Tropfwassers - Auf-

stellen des Röhrchens 5 min auf ein Filterpapier mit der Öffnung nach unten - wird das Röhrchen bei 90 - 95°C im Trockenschrank getrocknet und nach dem Erkalten (im Exsikkator) ausgewogen. Die Differenz zwischen beiden Wägungen - also Röhrchen mit den trockenen Zellen und der Leergewicht-Wägung - ergibt das TG der Zellen in der aufgenommenen Suspension.

6.2. TG-Bestimmung, Membran-Filter-Methode

Das Leergewicht des Membran-Filters (Membran-Filter BA 83/1, 50 mm Ø, 0,2 µm Porengröße, SCHLEICHER und SCHÜLL) wird bestimmt, eine Suspensionsprobe (10 - 15 ml; das Volumen ist von der Zellsuspensionsdichte abhängig) wird unter Vaccum durchfiltriert, die Zellen werden mit bidest. Wasser (doppelte Menge der aufgenommenen Zellsuspension) ausgewaschen.

Der Membran-Filter mit Zellen wird über Nacht bei 105°C im Trockenschrank getrocknet und nach dem Erkalten (im Exsikkator) ausgewogen. Die Differenz zwischen beiden Wägungen (Membran-Filter mit Zellen minus M-F-Leergewicht) ergibt das Trockengewicht der Zellen in der durchfiltrierten Suspension.

7. Bestimmung der Enzymaktivitäten

7.1. Enzymindikatoren (Malat-Dehydrogenase und NADH-Oxydase)

Die Bestimmung dieser Enzyme wurde nach den von AGGAG und SCHLEGEL (1973) beschriebenen Verfahren mit ein wenig Änderungen ausgeführt. Die Aktivität der einzelnen Enzyme wurde in dem Bereich linearer Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten Extraktmenge ermittelt, die spezifische Aktivität wurde in Einheit (E) pro mg Protein in zellfreien Extrakten angegeben.

Enzymatische Tests:

Bei den einzelnen Tests wurden die Lösungen in der angegebenen Reihenfolge zusammenpipettiert.

Testansatz:

a. Malat-Dehydrogenase:

2,5 ml	Pufferlösung; 0,001 M Tris-HCl, pH = 7,2
0,2 ml	10 mM NADH-Lösung
0,2 ml	25 mM Oxalessigsäure (pH 7 - 8; neutralisiert)
0,1 ml	Rohextrakt (bei konzentrierten Rohextrakten mit geeigneter Pufferlösung verdünnen)

b. NADH-Oxydase:

Es wird der gleiche Testansatz für Malat-DH hier verwendet, nur anstatt von 0,2 ml Oxalessigsäure werden 0,2 ml H_2O (bidest.) pipettiert.

Die Extinktionsänderungen bei beiden Enzymtests wurden in 1 cm-Glasküvetten bei 365 nm im ZEISS-Spectrophotometer (PL 4) gemessen und über einen TE-Wandler mit einem Kompensationsschreiber (VITATRON, Type UR 400, Holland) registriert. Die Messungen erfolgten bei Zimmertemperatur gegen Leerwert. Die wahre Malat-DH-Aktivität ergab sich durch Subtraktion der NADH-Oxydase von der gesamten (ausgerechneten) Malat-DH-Aktivität.

7.2. Enzymaktivität der Nukleasen
(RNase, DNase, Alkalinphosphate und Phosphodiesterase)

Anhand verschiedener Methoden zur Aktivitätsmessung der Nuklease-Enzyme (nach NADERSON und CARTER, 1965; ELEY und ROTH, 1966; NAKAO et al., 1968; LEE et al., 1968; IMADA et al., 1972a) wurde, nach einiger Modifikation bzw. Optimierung in den Testbedingungen für diese Enzyme, die Aktivität der einzelnen Enzyme in zellfreien Extrakten aus Hydrogenomonas-Zellen bestimmt. Die photometrischen Messungen wurden im ZEISS-Spectrophotometer (PL 4) bei den entsprechenden Wellenlängen für die einzelnen Tests gemacht. Die spezifische Aktivität wurde für jedes Enzym in einem Meßbereich linearer Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge ermittelt und in für jedes Enzym verschieden definierten Einheiten (E) pro mg Protein angegeben.

Modifizierte Nuklease-Enzymtests

7.2.1. RNase-Enzymtest

1. Testansatz:

   0,4 ml 0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH = 8, 0,02 M $MgSO_4$

   0,2 ml 2%ige RNS (aus Hefen; BDH)

   0,4 ml Rohextrakt

2. Inkubation vom Testansatz bei 37°C für 60 min.

3. Nach dem Abkühlen auf °C wird 1 ml UPCS (aus 0,25%igem Uranylacetat in 2,5%iger Perchlorsäure) zugefügt.

4. Nach 15 min Inkubation bei °C wird das Röhrchen mit Inhalt (2 ml) bei 0 - 4°C mit 5000 Upm 15 min lang abzentrifugiert.

5. Im Überstehenden wurde nach einer 1 : 5 Verdünnung mit bidest. Wasser die End-Extinktion bei 260 nm im ZEISS-Spectrophotometer (PL 4) in Quarzküvetten mit 1 cm Lichtweg gegen eine Kontrollprobe (1 : 5 verdünnt) gemessen.

6. Enzymaktivität: 1 E = Extinktionsänderung bei 260 nm von 0,01 nach 60 min Testansatz-Inkubation bei 37°C.

7.2.2. DNase-Enzymtest

1. Testansatz:

0,4 ml M · Tris-HCl-Puffer, 0,02 M Mg SO_4, pH = 10

0,2 ml 1%iger DNS (aus Kalb-Thymus; BDH)

0,4 ml Rohextrakt

Schritte 2, 3, 4, 5 und 6 siehe RNase-Test.

7.2.3. Alkalische Phosphatase-Enzymtest

1. Testansatz:

0,2 ml 2 mM p-Nitrophenylphosphat

0,7 ml 0,25 M Tris-HCl Puffer, pH = 8

0,1 ml Rohextrakt.

2. Inkubation vom Testansatz für 30 min bei 37°C.

3. Abstoppen der Reaktion durch Zusatz von 1 ml 0,5 M NaOH.

4. Extinktionsmessung bei 400 nm in einem ZEISS-Spectrophotometer (PL 4) in Glasküvetten mit 1 cm Lichtweg gegen eine Kontrollprobe.

5. Enzymaktivität: 1 (E) = Extinktionsänderung bei 400 nm von 0,1 in 30 min.

7.2.4. Phosphodiesterase-Enzymtest

1. Testansatz:

   0,5 ml 1 mM bis-p-Nitrophenylphosphat

   0,25 ml 0,5 M Tris-HCl-Puffer, pH = 8, 0,01 M $MgSO_4$

   0,25 ml Rohextrakt.

2. Inkubation bei 37°C für 5 Std.

3. Zusatz von 1 ml 0,5 M NaOH (Reaktion-Stopp).

4. Abzentrifugation bei 4000 Upm 15 min, im Überstehenden Messung der Extinktion bei 400 nm im ZEISS-Spectrophotometer (PL 4) in Glasküvetten mit 1 cm Lichtweg gegen eine Kontrollprobe.

5. Enzymaktivität: 1 (E) = Extinktionsänderung bei 400 nm von 0,1.

8. Gewinnung von zellfreien Extrakten

Gefriergetrocknete oder frisch abgeerntete Zellen wurden 1 - 2 mal mit einem 0,02 M Tris-HCl-Puffer, pH = 7,2 - 7,4, gewaschen. Bei der Herstellung von Rohextrakten zu enzymati-

schen Tests wurden die Zellen in dem gleichen Puffer resuspendiert, für die Isolierung bzw. Gewinnung von Ribosomen-Fraktion wurden sie im TMK-Puffer (0,01 M Tris-HCl, 0,001 M Mg-Acetat, 0,01 M KCl, pH = 7,4) resuspendiert.

Zur Bereitung der Rohextrakte wurden die Zellen (ca. 5%ige Zellsuspension mit einem Volumen von 5 - 20 ml) bei 0 - 4°C in der French-Presse (Typ MP 40/200) unter einem Druck von ca. 70 kg/cm^2 aufgeschlossen.

Die Herstellung zellfreier Extrakte wurde anschließend durch Entfernung der Zelltrümmer durch zweimalige Zentrifugation der Homogenate (aufgeschlossene Zellen) bei 15.000 x g für je 30 min Dauer in einer Omikron-Zentrifuge (Fa. HERAEUS-CHRIST, Osterode) gewährleistet. Der zuletzt entstandene Überstand wurde als Rohextrakt zu enzymatischen Tests oder zur weiteren Verarbeitung bei der Ribosomen-Isolierung verwendet.

9. Rohextrakt-Entsalzen durch Sephadex G-25

Zum Entsalzen von zellfreien Extrakten wurde die Menge des konzentrierten Extraktes (10 - 20 ml) auf eine Sephadex G-25-Säule (2,6 x 40) gegeben (Literatur: Sephadex-Gel filtration in theory and practice, 1971, Pharmacia fine Chemicals, Sweden). Mit einer 0,01 M Tris-HCl Pufferlösung, pH = 7,4 wurden die Extrakte eluiert, es wurden Proben zu je 1,5 - 2 ml aufgefangen (Fraktionssammler; LKB 7000-Ultro Rac, Schweden). Anhand der Warburg und Christian-Tabelle (Bestimmung der Extinktionen 280/260 nm) wurden die Fraktionen mit hohem Proteingehalt gesammelt und zusammengemischt, die anderen Fraktionen wurden zurückgelassen.

10. Entsalzen von freigesetzten RNS-Abbauprodukten

Zum Entsalzen von freigesetzten RNS-Abbauprodukten wurde das Abbauprodukt auf eine Säule mit Aktivkohle (Norite) gegeben. Die RNS-Abbauprodukte werden an Kohle adsorbiert, die Salze ausgewaschen. Mit bidestilliertem Wasser werden die Reste der Salze ausgewaschen (1 - 2 mal), danach werden die RNS-Abbauprodukte mit Äthanol desorbiert.

Mit Hilfe vom Rotationsverdampfer (BÜCHI, Schweiz) wird Äthanol verdampft (bei 20°C), der Rückstand (RNS-Abbauprodukte) wird in bidestilliertem Wasser (kleines Volumen) aufgelöst; es ergibt dann ein entsalztes RNS-Abbauprodukt, das zur Auftragung auf DC-Platten verwendet wird.

11. Dünnschicht-Chromatographie

Die Auftrennung der Nukleinsäure-Derivate bzw. Abbauprodukte wurde anhand mehrerer Literaturangaben (von RANDERATH, 1961a, 1961b, 1963, 1965; STAHL, 1967 u.a.) durch DC-Chromatographie durchgeführt.

Methode:

Auf PEI-Cellulose-Platten (DC-Fertigplatten, G mit Leuchtstoff; SCHLEICHER und SCHÜLL, Dassel) wurden sowohl die durch die Hitzebehandlung freigesetzten bzw. entsalzten RNS-Abbauprodukte aus PHB^{-}4 (5 µl = 50 mg) als auch die reine RNS-Derivate (Fa. SERVA, Heidelberg) in nachweisbaren Mengen aufgetragen. Die Platten wurden anschließend in einer Trogkammer, die durch Filterpapierauskleidung mit dem Fließmittel (1 M NaCl-Lösung) gesättigt war, eingestellt.

Nach ca. 90 min Laufzeit wurden die Platten aus der Trogkam-

mer entfernt und getrocknet. Die aufgetrennten Komponenten der RNS-Abbauprodukte aus PHB$^-$4-Zellen und die aus reinen RNS-Derivaten wurden unter UV-Licht (UV-Lampe, 366/254 nm, CAMAG) bei der Wellenlänge 254 nm nachgewiesen oder erkannt. Die erkennbaren Flecken wurden gekennzeichnet und auf Transparentpapier übertragen.

Anhand der Laufstrecke bzw. R_F-Werte der schon nebeneinander am gleichen Chromatogramm geordneten Auftragungen von unbekannten RNS-Abbauprodukten und der einzelnen RNS-Derivate konnten die vergleichbaren Komponenten identifiziert und erkannt werden.

$$R_F\text{-Wert} = 100 \times \frac{\text{Entfernung des Fleckmittelpunktes vom Startpunkt (mm)}}{\text{Entfernung der Fließmittelfront vom Start (mm)}}$$

Weiterer Nachweis konnte durch ein Densitometer (VITATRON, TLD 100) unter UV-Licht (UV-Filter) durchgeführt werden, bei dem die Intensität der Durchlochung des fluoreszierenden Materials und damit die Intensität der aufgetragenen Komponenten bzw. ihrer Entfernung vom Startpunkt erfaßt und über ein TE-Wandler mit einem Kompensationsschreiber (VITATRON, UR 400) registriert wurde.

12. Chemikalien

Diphenylamin (DPA, puriss·p·a) stammte von der Fa. FLUKA AG; Oxalessigsäure und $NADH_2$ (red., Na-Salz) von C.F. BOEHRINGER & Söhne, Mannheim; Rinderserumalbumin von der Fa. Th. SCHUCHARDT, München; Orcin, p.a., kristallines Uranylacetat von der Fa. MERCK AG, Darmstadt; p-Nitrophenyl-Phosphat (Na_2-Salz), bis-p-Nitrophenylphosphat (Na-Salz), RNS-Komponenten (Adenin, Adenosin, AMP, ADP, ATP, Guanin, Guanosin, GMP, GDP,

GTP, Cytosin, Cytidin, CMP, CDP, CTP, Uracil, Uridin, UMP, UDP, UTP, Ribose und Ribose-5-Phosphat) von der Fa. SERVA, Heidelberg; RNS aus Hefe, DNS (Na-Salz, from Thymus-Gland) von der BDH (BRITISH DRUG HOUSES) Poole, England; Sephadex G-25 von der Fa. PHARMACIA, Uppsala, Schweden; PEI-Cellulose (DC-Fertigplatten) von der Fa. SCHLEICHER und SCHÜLL, Dassel; n-Butanol von der Fa. BAKER, Holland. Die übrigen p.a. Chemikalien wurden von der Fa. MERCK AG, Darmstadt, bezogen.

III. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

1. Wachstum und Ernte

1.1.1. Wachstum des Wildtyps und der PHB-freien Mutante unter normalen Wachstumsbedingungen

Der Wildtyp Hydrogenomonas eutropha H16 und die davon abgeleitete PHB-freie Mutante PHB$^-$4 wurden autotroph in 10 l Fermentern herangezogen. Während des Wachstums wurde die optische Dichte (Extinktion) bei einer Wellenlänge von 436 nm in einem ZEISS-Spectrophotometer (PL 4) in 1 cm Glasküvetten bestimmt. Auch der Protein- und Nukleinsäuregehalt wurde ermittelt. Das Trockengewicht der Zellen wurde aus der Trübung (Extinktion) der Suspension unter Anwendung eines Umrechnungsfaktors von 0,18 mg TG/ml je Extinktionseinheit ($Ext._{436}$) bei H16 und 0,23 mg TG/ml je Extinktionseinheit ($Ext._{436}$) bei PHB$^-$4 ermittelt. Der Verlauf der Trübung bei den Stämmen (H16) und (PHB$^-$4) wurde in Abbildung 1 graphisch dargestellt.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die beiden Stämme H16 (Wildtyp) und PHB$^-$4 hinsichtlich ihrer Wachstumgsgeschwindigkeit (Verdopplungszeit von ca. 140 Minuten bei H16 und 144 - 148 Minuten bei PHB$^-$4) sowie bezüglich ihres Gehaltes an Zellbestandteilen (Protein und Nukleinsäure) bis zum Ende der exponentiellen Phase weitgehend identisch sind. Die Trübung der Suspension zeigte den typischen Verlauf einer sigmoiden Wachstumskurve. Weiterhin war der Gehalt an Protein, RNS und DNS bei beiden Stämmen während der exponentiellen Wachstumsphase ziemlich konstant; die Zellen bestanden aus mehr als 60% Protein, 13 - 16% RNS und 4 - 6% DNS (vom Trockengewicht). In dieser Wachstumsphase ergab der Quotient von Protein zu Nukleinsäure (RNS und DNS) einen Mittelwert von (3 - 3,5 : 1).

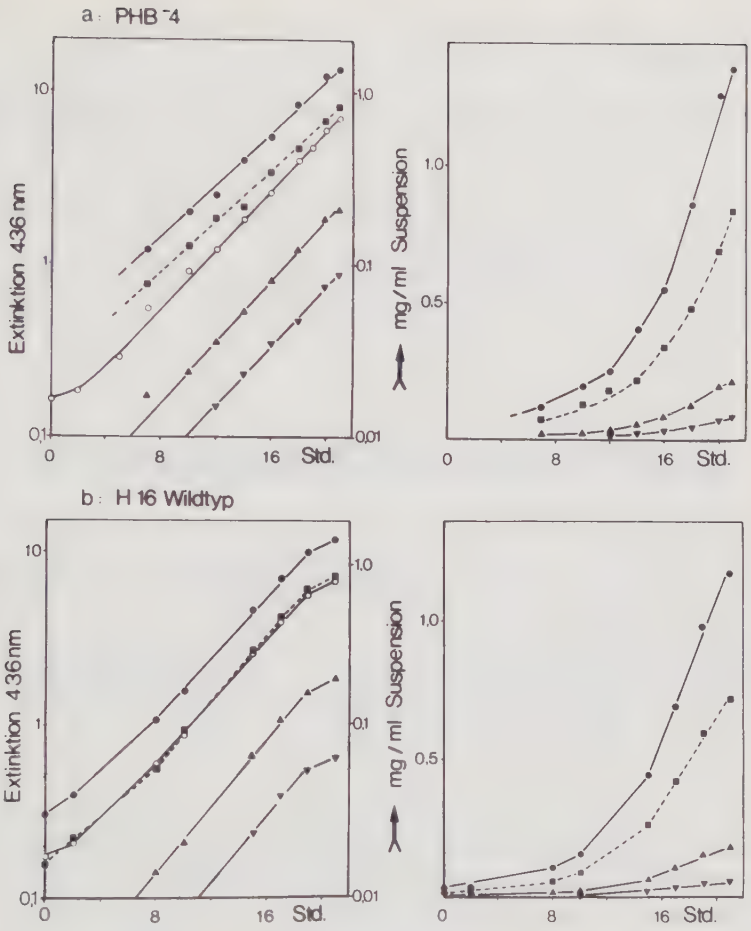


Abb. 1: Wachstumskurven für Hydrogonomonas eutropha H16 Mutante PHB⁻4 (a) und Wildtyp (b). Zunahme von Trockengewicht, Protein, Trübung, RNS und DNS während des Wachstums unter autotrophen Bedingungen in einem 10 l Fermenter. Die Bedingungen entsprechen den Standardwachstumsbedingungen. Der linke Teil gibt bei (a) und (b) die halblogarithmische, der rechte Teil die arithmetische Auftragung wider.

●———● Trockengewicht in mg pro ml Suspension,
■- - - -■ Protein (mg/ml),
○———○ Trübung (Ext. 436 nm),
▲———▲ RNS (mg/ml),
▼———▼ DNS (mg/ml).

1.1.2. Ernte

Die Zellen wurden am Ende der exponentiellen Wachstumsphase (bei einer Extinktion von 7 - 8) durch Abzentrifugieren der Zellsuspension in einer Cepa-Durchlaufzentrifuge (Fa. FALBERG, Lahr) bei 36 000 x g geerntet. Die so erhaltenen Zellen wurden in einer Gefriertrockenanlage (VIRTIS, GARDINER, New York) gefriergetrocknet und zum späteren Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

1.2. Wachstum des Stammes PHB⁻ 4 unter Mangelbedingungen

Bei diesen Versuchen sollte an autotroph gewachsenen PHB⁻ 4 untersucht werden, inwieweit sich das Wachstum der Zellen sowie der Gehalt an Zellbestandteilen (Protein, RNS und DNS, der Protein-Nukleinsäure-Quotient inbegriffen) verändert, wenn die Zellen in Mangel-Nährlösungen übertragen werden, denen eine für das normale Wachstum notwendige Verbindung fehlte: Stickstoff-, Magnesium-, Phosphat- und Schwefelquelle.

Für jeden Mangel-Versuch an einer dieser Verbindungen wurde als Vorkultur ein 10 l Fermenter (Kapazität 8 l Nährlösung) unter normalen autotrophen Bedingungen gezogen. Die Zellen wurden bei einer Extinktion (436 nm) von 7 bis 8 geerntet, möglichst steril abzentrifugiert (Cepa), abermals gewaschen und in steriler 0,9%iger NaCl-Lösung resuspendiert. Die so erhaltenen Zellen wurden in die Fermenter überführt, die Zelldichte bei diesen Fermentern lag zwischen 4 und 5 Extinktionseinheiten (Ext. 436 nm). Für die Trübungsmessung*, Pro-

* Bei Stickstoff-Mangel wurde die Trübungsmessung (Ext. 436 nm) bei ZEISS-Filterphotometer (Fl 4), bei Mg^{++}-, PO_4^{---}- und SO_4^{--}-Mangel wurde sie beim ZEISS-Filterphotometer gemessen.

tein- und Nukleinsäure Gehaltbestimmung wurden Proben aus den einzelnen Kulturen in bestimmten Zeitintervallen entnommen. Die Auswertung der einzelnen Proben ergab für die einzelnen Mangel-Bedingungen folgende Resultate:

1. Inkubation unter Stickstoff-Mangel

Beim Stickstoff-Mangelversuch (Abbildung 2a) führte die Inkubation der Zellen unter Stickstoff-Mangel zu keiner Veränderung der optischen Dichte, während sich der RNS-Gehalt der Zellen um 2 - 3% (vom TG) erniedrigte. Der Gehalt an Protein sowie an DNS blieb aber unverändert. Der Quotient von Protein zu Nukleinsäure ergab in diesem Versuch eine leichte aber unbedeutende Verschiebung zugunsten des Proteins, die zu vernachlässigen ist.

2. Inkubation unter Phosphat-Mangel

Beim Phosphat-Mangelversuch (Abbildung 2b) wurde im Laufe der 9stündigen Inkubationszeit ein leichter Anstieg bezüglich der Optischen Dichten (von 6 auf 9) ermittelt, der jedoch keinen typischen Verlauf einer Wachstumskurve aufwies. Bis zum Ende der Anzuchtszeit blieb der DNS-Gehalt konstant während sich der RNS-Gehalt um 2% (vom Trockengewicht) erniedrigte. Ler Proteingehalt stieg aber während dieser Zeit um 5 - 10% (vom TG) als dessen Gehalt bei Versuchsanfang an, und er verursachte eine leichte Verschiebung des Protein-Nukleinsäure-Quotienten zugunsten des Proteins.

3. Wachstum (Inkubation) unter Magnesium- und Sulfat-Mangel

Bei den Magnesium- und Sulfat-Mangelversuchen (Abbildung 2c und d) wurde kein Zellwachstum im Laufe der Inkubationszeit ermittelt. Die Zusammensetzung der Zellen an Protein, RNS und DNS sowie der Quotient von Protein zu Nukleinsäuren (RNS und DNS) waren entsprechend dem Zellwachstum konstant geblieben.

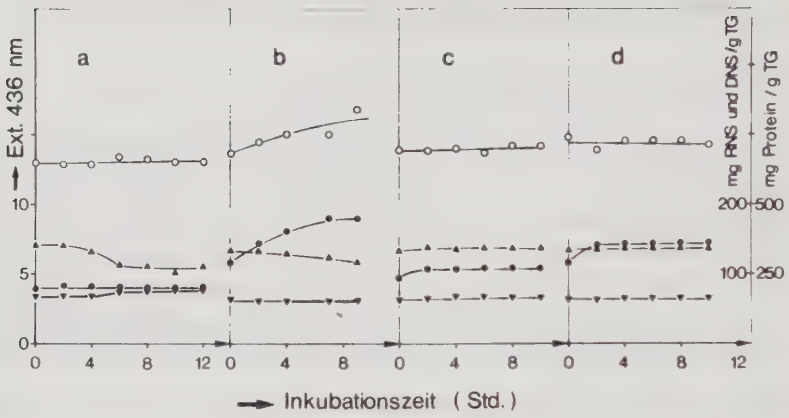


Abb. 2: Wachstum der PHB⁻4-Zellen unter Mangelbedingungen. Veränderung der Zusammensetzung der Bakterien bezüglich Trübung, Protein, RNS und DNS während einer mehrstündigen Inkubation unter Wachstumsbedingungen, jedoch unter Mangel an einer Nährlösungskomponente (a an Stickstoff; b an Phosphat; c an Magnesium und d an Sulfat).

●——●Trübung (Ext. 436 nm),
○——○Protein (mg/g Trockengewicht),
▲——▲RNS (mg/g TG),
▼——▼DNS (mg/g TG).

2. Herabsetzung des Nukleinsäuregehaltes im EZP-Produkt aus Hydrogenomonas-Zellen

Da der Nukleinsäuregehalt der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen unter normalen Wachstumsbedingungen proportional ist, haben die Zellen von Hydrogenomonas eutropha einen hohen Nukleinsäuregehalt (RNS 13 - 16%; DNS 4 - 6%).

Zur Gewinnung von proteinreichen nukleinsäurearmen Zellen bieten sich verschiedene Möglichkeiten an; davon werden hierbei nur einige aufgezählt.

1. Hitzebehandlung:

Das Verfahren zur Erniedrigung des Nukleinsäuregehaltes durch die Hitzebehandlung wurde mit EZP-Produkt aus Hefen (Candida utilis, C. lipolytica, C. silivicola) durchgeführt (MAUL et al., 1970; OHTA et al., 1971; IMADA et al., 1972a; COONEY und LEVINE, 1972).

Die Hitzebehandlung nach diesen Autoren bestand aus zwei nacheinderfolgenden Schritten:

a. Hitzeschock-Behandlung für wenige Sekunden bei relativ hoher Temperatur (68°C).

b. Nachinkubation bei mittlerer Temperatur (50 - 55°C) für 2 bis 3 Stunden.

Der Nukleinsäuregehalt (vor allem an RNS) sollte durch diese Behandlung von 7 - 11% auf weniger als 2% (vom Trockengewicht) erniedrigt werden.

2. Extraktion der Nukleinsäure - Purinstickstoff

Die Hefezellen werden zuerst mit kalter 2 N NaOH-Lösung

1 Std. digeriert und mehrfach mit kaltem Wasser gewaschen. Die NS-Purinstickstoffe werden dann durch 10%ige NaCL-Lösung 72 Std. lang bei 80°C extrahiert (DIRR und DECKER, 1944). Dabei sollten über 90% des Purinstickstoffs entfernt werden.

3. Sedimentierung des Zellproteins:

Die Sedimentierung des Zellproteins sollte bei 80°C in mechanisch aufgeschlossenen Zellen (Hefe-Zellen) bei einem pH-Wert von 9.5 und bei Vorhandensein von 10%igem NaCl durchgeführt werden. Der Nukleinsäuregehalt sollte im Proteinprodukt auf weniger als 2% (vom TG) herabgesetzt werden (HEDENSKOG, EBBINGHAUS, 1972; HEDENSKOG, MOGREN, 1972).

4. Alkalische RNS-Hydrolyse:

Die alkalische RNS-Hydrolyse (pH 8 bis 12) sollte mit NaOH allein oder in Kombination mit γ-Bestrahlung durchgeführt werden (CANERA et al., 1972).

5. Exogene-Enzym-Hydrolyse der Nukleinsäuren

Der Abbau von Nukleinsäuren könnte weiterhin durch den Zusatz von fertigen Nuklease-Enzympräparaten erreicht werden (SCHLENK, DAINKO, 1965; CASTRO et al., 1971).

Im Hinblick auf Wirtschaftlichkeit, technische Handhabung und hygienische Zuverlässigkeit ist der Hitzebehandlung unter den oben erwähnten Möglichkeiten zur Erniedrigung des NS-Gehaltes der Vorzug zu geben.

Da die bisherigen Untersuchungen über die Hitzebehandlung ausschließlich nur mit Hefen ausprobiert worden waren, bestand ein besonderes Interesse daran, ein analoges Verfahren für Hydrogenomonas-Bakterien zu entwickeln.

Hitzebehandlung-Verfahren bei Hydrogenomonas-Bakterien des Stammes (PHB$^-$4)

Die Hitzebehandlung wurde sowohl an Zellen von Hydrogenomonas eutropha H16 (Wildtyp als auch dessen Mutante Stamm PHB$^-$4 durchgeführt. Bei beiden Stämmen stimmten die erzielten Ergebnisse weitgehend überein, so daß für den weiteren Verlauf der Versuche nur noch Zellen von Stamm PHB$^-$4 aufgearbeitet wurden.

2.1. Ermittlung der optimalen Hitzebehandlungsbedingungen

Die nächstliegende Frage für die Hitzebehandlung war die günstigste Temperatur und ihre Applikationszeit sowohl für den Hitzeschock als auch die Nachinkubation zu ermitteln und die Wirkung der Hitzebehandlung auf die Bestandteile der Zelle an Protein und Nukleinsäuren (RNS und DNS) zu untersuchen. Dabei wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

2.1.1. Optimierung von Zeit und Temperatur der Hitzeschock-Behandlung

Zur Optimierung der Hitzeschock-Behandlung wurden die Zellen Zeitintervalle lang auf verschiedene Temperaturen erhitzt und danach für eine bestimmte Zeitdauer bei 50°C inkubiert.

a. Hitzeschock-Behandlung

Die Zellsuspension* wurde in Portionen von je ca. 60 ml in

* Zellsuspensions-Vorbereitung: ca. 0,5 g gefriergetrocknete Zellen, autotroph gewachsen, am Ende der exponentiellen Phase geerntet, wurden in 1000 ml 0,1%iger NaCl-Lösung resuspendiert; für weiteren Gebrauch wurden die Zellsuspensionen in gleicher Weise hergestellt.

300 ml Erlenmeyerkolben, die vorher bereits auf die geeigneten Hitzeschock-Temperaturen erhitzt worden waren, aufgeteilt. Es wurden Temperaturen von 45, 50, 55, 60, 65 und 70°C angewandt. Bei jeder dieser Temperaturen wurden die einzelnen Portionen 10 sec, 1, 5 und 10 min lang behandelt; z.B. bei 45°C wurden die Portionen 1, 2, 3, 4 für die Zeiten 10 sec, 1, 5 und 10 min in der gleichen Reihenfolge behandelt, usw., am Ende der Behandlung wurden die Portionen schnell in Eiswasser gekühlt.

b. Hitzenachinkubation bei 50°C

Die einzelnen hitzeschock-behandelten Portionen wurden in Zentrifugengläser (1,5 x 10 cm) in Kleinproben zu je 5 ml aufgeteilt und bei 50°C für die Zeitdauern zwischen 0 und 180 min inkubiert. Zur Zeit 0, 30, 60, 90, 120, 150 und 180 min Nachinkubation wurden die Kleinproben 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7 in der gleichen Reihenfolge für jede ursprüngliche Portion abgestellt, gekühlt und bei 4000 U/min für 20 min abzentrifugiert.

Im Überstehenden der der Hitzebehandlung ausgesetzten Proben wurde die Extinktion des bei 260 nm absorbierenden Materials (Nukleinsäureabbauprodukte u.ä.) im ZEISS-Spectrophotometer (PL 4) in QS-Küvetten mit 1 cm Lichtweg gegen den Überstand der Proben ohne Hitzebehandlung (= Nullwert) gemessen. Die gemessenen Extinktionswerte (Ext. 260 nm) der einzelnen Kleinproben (1 bis 7) für jede Portion wurden gegen den Zeitablauf von 0 bis 180 min Nachinkubation graphisch aufgetragen (Abbildung 3).

Von dem Verlauf der Extinktionswerte bei jeder Hitzeschockbehandlung (bei verschiedenen Temperaturen und Zeiteinheiten) während der Nachinkubationszeit ergab sich, daß die Hitzeschockbehandlung bei der Temperatur über 60°C am effektivsten war. Weiterhin war die Zeitdauer von 10 min Hitzeschock bei

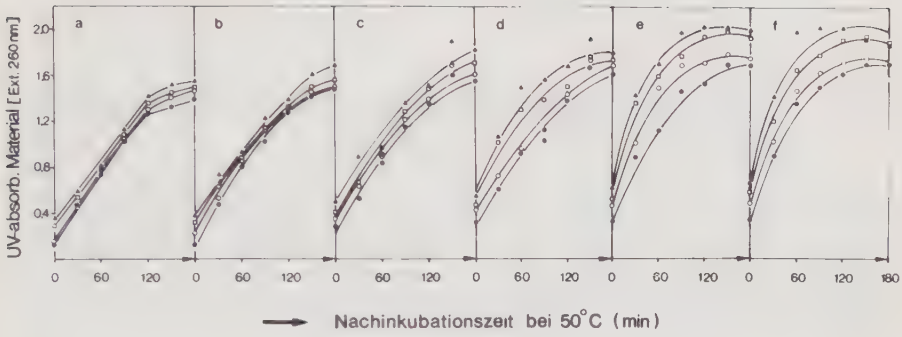


Abb. 3: Optimierung von Zeit und Temperatur der Hitzeschockbehandlung:
Einfluß der Temperatur und der Dauer der Hitzeschockvorbehandlung der Zellen auf die Rate des Austretens und die Menge der ausgeschiedenen RNS-Spaltprodukte aus den Zellen, gemessen an der Zunahme des bei 260 nm absorbierenden Materials in der Suspensionslösung. Autotroph gewachsene Zellen wurden bei verschiedenen Temperaturen Hitzeschock-behandelt (a bei 45°C, b bei 50°C, c bei 55°C, d bei 60°C, e bei 65°C und f bei 70°C). Nach 10 sec und 1, 5 und 10 min wurden Proben entnommen und bei 50°C 3 Std. lang nachinkubiert. Die Geschwindigkeit des Austretens von Abbauprodukten der Nukleinsäuren wurde an der Zunahme des UV absorbierenden Materials (gemessen gegen Suspension der Zellen ohne Behandlung) verfolgt.

Dauer der Hitzeschockbehandlung:
▲——▲ 10 min,
□——□ 5 min,
○——○ 1 min,
●——● 10 sec.

allen Behandlungstemperaturen allen anderen verwendeten Zeiteinheiten (10 sec, 1 und 5 min) überlegen.

2.1.2. Optimierung von Zeit und Temperatur der Hitzenachinkubation

Ergänzend zu dem vorigen Versuch (2.1.1.) wurden zur Optimierung von Temperatur und Zeit der Nachinkubation weitere Versuchsreihen durchgeführt. Dabei wurden die Zellen nach dem Hitzeschock (bei 65°C) bei variierten Temperaturen in der Zeit von 0 bis 180 min inkubiert.

Die Zellsuspension (0,5 g TG-Zellen/1000 ml 0,1%iger NaCl-Lösung) wurde in drei Hauptportionen aufgeteilt. Die erste Portion wurde 10 sec, die zweite 5 min und die dritte 10 min bei 65°C (Hitzeschock) inkubiert. Die Wasserbäder für die Nachinkubation wurden bei 45, 50, 55, 60 und 70°C eingestellt. In jedem Wasserbad wurden jeweils 6 Proben (zu je 5 ml) 1, 2, 3, 4, 5 und 6 der ursprünglichen Portionen (mit 10 sec, 5 und 10 min Hitzeschock) inkubiert. Nach 0, 30, 60, 90, 120 und 180 min wurden die entsprechenden Proben 1 bis 6 aus den Inkubationsbädern entfernt, abgekühlt und bei 4000 U/min 20 min lang abzentrifugiert.

Im Überstehenden der so behandelten Proben wurde die Extinktion bei 260 nm gegen das Überstehende der Probe ohne Hitzebehandlung (Nullwert) gemessen. Die gemessenen Extinktionswerte für die einzelne Probenreihenfolge 1 bis 6 wurden gegen Zeitablauf (0 bis 180 min) der Nachinkubation bei den verschiedenen Temperaturen graphisch aufgetragen (Abbildung 4).

Aus dem Verlauf der einzelnen Werte könnte ermittelt werden

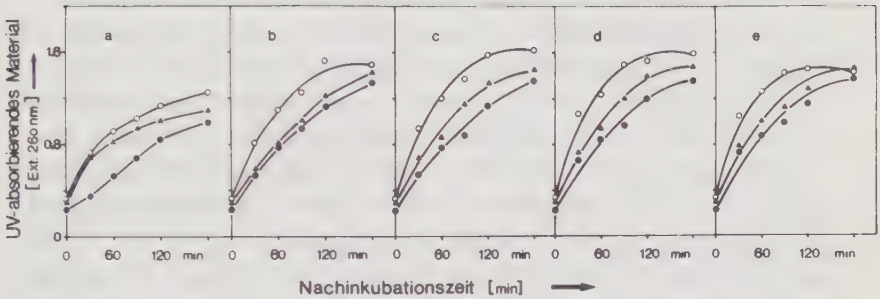


Abb. 4: Optimierung von Zeit und Temperatur der Nachinkubation.

Der Einfluß der Temperatur und Dauer der Nachinkubation auf die Rate des Austretens bzw. die Menge der ausgeschiedenen RNS-Spaltprodukte aus den Zellen wurde an der Zunahme des bei 260 nm absorbierenden Materials in der Suspensionslösung gemessen. Autotroph gewachsene Zellen wurden bei 65°C für die Dauer von 10 sec, 5 und 10 min einer Hitzeschockvorbehandlung ausgesetzt. Die Nachinkubation erfolgte bei den Temperaturen: a bei 45°C, b bei 50°C, c bei 55°C, d bei 60°C, e bei 70°C; die Nachinkubation erfolgte 180 min lang. Verlauf des bei 260 nm absorbierenden Materials während der Nachinkubation bei den Proben mit einer Hitzeschockvorbehandlung bei 65°C für

o——o 10 min,
▲——▲ 5 min,
●——● 10 sec.

1. Zur Nachinkubation hatten die Temperaturen 50, 55 und 60°C den günstigsten Effekt auf die Ausscheidung von Nukleinsäure-Abbauprodukten.

2. Aus dem Verlauf der gemessenen Extinktionswerte während der Nachinkubationszeit ist zu ersehen, daß die Geschwindigkeit der Ausscheidung von Nukleinsäure-Abbauprodukten bei den meisten Proben in der ersten Inkubationsstunde höher war als in der folgenden Inkubationszeit. Dieses Erscheinungsbild war bei den Proben, die einem 10 min Hitzeschock bei 65°C ausgesetzt worden waren, am deutlichsten. Weiterhin waren zwei Stunden Nachinkubation bei 50 - 55°C ausreichend, um den höchstmöglichen Nukleinsäureabbau zu erzielen, insbesondere wenn die Zellen zuvor mit 10 min Hitzeschock bei 65°C behandelt worden waren.

3. Die Inkubationstemperaturen von 50, 55 und 60°C bezüglich der Ausscheidung von Nukleinsäure-Abbauprodukten aufgetretenen Unterschiede waren sehr gering. Es war empfehlenswert, eine Hitzebehandlung mit einer niederen Inkubationstemperatur auszuwählen, die den Nukleinsäuregehalt stark herabsetzt, ohne dabei unerwünschte Auswirkungen auf andere Zellbestandteile wie Protein zu verursachen.

2.2. Auswirkung des Hitzebehandlungsverfahrens (Hitzeschock und Nachinkubation) auf die Zellbestandteile Protein und Nukleinsäure

Parallel zu den vorangegangenen Versuchen (2.1.1. und 2.1.2.) wurden weitere Versuche unternommen, deren Ziel es war, die Veränderung des Gehaltes an Protein, DNS und RNS während der Hitzebehandlung unter den verschiedenen Bedingungen zu ermitteln.

Die Hitzebehandlung wurde wie folgt durchgeführt:
Die Zellsuspension (2 g TG Zellen/1000 ml 0,1%iger NaCl-Lösung) wurde in Kleinproben von je 40 ml aufgeteilt. Die Hitzeschock-Behandlung wurde bei den Temperaturen 45, 50, 60, 65, 70 und 80°C für die folgenden Zeiteinheiten durchgeführt.

1. Bei jeder der Temperaturen 45 und 80 Hitzeschock für 10 sec und 10 min.

2. Bei jeder der Temperaturen 50, 60, 65 und 70 Hitzeschock für die Zeiten 10 sec, 5 und 10 min.

Nach dem Erkalten (im Eiswasser) am Ende der Hitzeschockbehandlung wurden die einzelnen Proben in Zentrifugengläser (1,5 x 10 cm) aufgeteilt. Aus jeder Probe wurden 3 Proben zur Proteinbestimmung zu je 2 ml und 3 Proben zur Nukleinsäurebestimmung zu je 10 ml auspipettiert. Die Proben in Zentrifugengläsern wurden bei 50°C inkubiert; zur Zeit 0, 60 und 120 min Inkubation wurden die Proben 1, 2 und 3 zur Protein- bzw. Nukleinsäurebestimmung für jede Hitzeschockbehandlung aus dem Inkubationsbad entfernt, abgekühlt und bei 4000 U/min 20 min lang abzentrifugiert. Das Überstehende wurde dekantiert und im niedergeschlagenen Pellet wurde bei den entsprechenden Proben die Protein- und Nukleinsäurebestimmung durchgeführt.

Die erhaltenen Bestimmungswerte in % vom Trockengewicht (TG) der ganzen Zellen für Protein, RNS und DNS wurden für die verschiedenen Hitzeschock-behandelten Proben bei verschiedenen Temperaturen (45, 50, 60, 65, 70 und 80°C) gegen die Zeitintervalle (nach 0, 60, 120 min) der Nachinkubation (bei 50°C) graphisch aufgetragen. Daraus ergaben sich folgende Ergebnisse:

2.2.1. Auswirkungen auf den Proteingehalt

Durch die Proteinbehaltbestimmung vor und während der Hitzebehandlung (nach dem Hitzeschock und während der Nachinkubation) unter den schon genannten Bedingungen wurden,wie in Abbildung 5 dargestellt, folgende Resultate erzielt:

1. Durch die Hitzeschock-Behandlung für 10 sec, 5 und 10 min bei Temperaturen zwischen 45 und 65°C (zur Zeit o. Nachinkubation) sowie durch die nachfolgende Inkubation bei 50°C (für 60 bzw. 120 min) wurden keine wesentlichen Veränderungen bezüglich des Proteingehaltes erzielt. Die Hitzeschock-Behandlung für 10 sec bei 70°C und 80°C ergab den gleichen Effekt. Der Proteingehalt nach diesen Behandlungen blieb bei einem Wert zwischen 60 und 65% (vom TG).

2. Die Hitzeschock-Behandlung für 10 min Zeitdauer bei 70°C und 80°C (Abbildung 5e und f) verursachte einen Proteinverlust von etwa 7% vom TG (bei 70°C) und 10% vom TG (bei 80°C). Diese Proteinabnahme wurde mit fortschreitender Nachinkubation bei 50°C fortgesetzt und erreicht nach 2 Stunden Inkubation etwa 10% bei 70°C und 20% bei 80°C vom Trockengewicht.

2.2.2. Auswirkungen auf den Gehalt an Nukleinsäuren (DNS und RNS)

1. DNS-Gehaltveränderung:

Der DNS-Gehalt wurde durch die verschiedenen Hitzebehandlungen nicht beeinflußt, der DNS-Gehalt bei Zellen ohne und mit Hitzebehandlung blieb konstant und betrug etwa 5 $\pm$ 0,5% vom Trockengewicht (Abbildung 6).

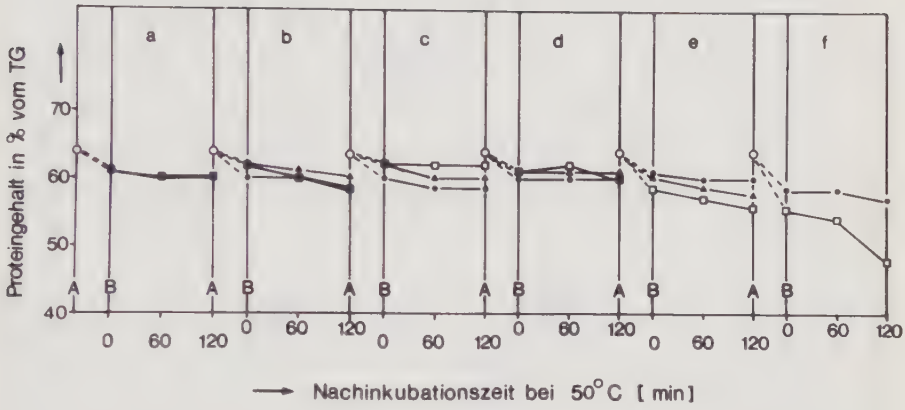


Abb. 5: Einfluß der Temperatur und der Dauer der Hitzeschockvorbehandlung auf den Proteingehalt der Zellen.

Autotroph gewachsene Zellen wurden 10 sec, 5 und 10 min lang verschiedenen Temperaturen (a bei 45°C, b bei 50°C, c bei 60°C, d bei 65°C, e bei 70°C und f bei 80°C) ausgesetzt und 0, 60 und 120 min bei 50°C nachinkubiert. Nach Abzentrifugation der Zellen wurde der Proteingehalt (Biuret-Methode nach SCHMIDT et al., 1963) gemessen. A: Proteingehalt der Zellen ohne Hitzebehandlung, B: Proteingehalt nach dem Hitzeschock und zur Zeit 0 min Nachinkubation. Verlauf des Proteingehaltes während der Nachinkubation bei den Proben mit einer Hitzeschockbehandlung bei 65°C für

●——● 10 sec,
▲——▲ 5 min,
□——□ 10 min.

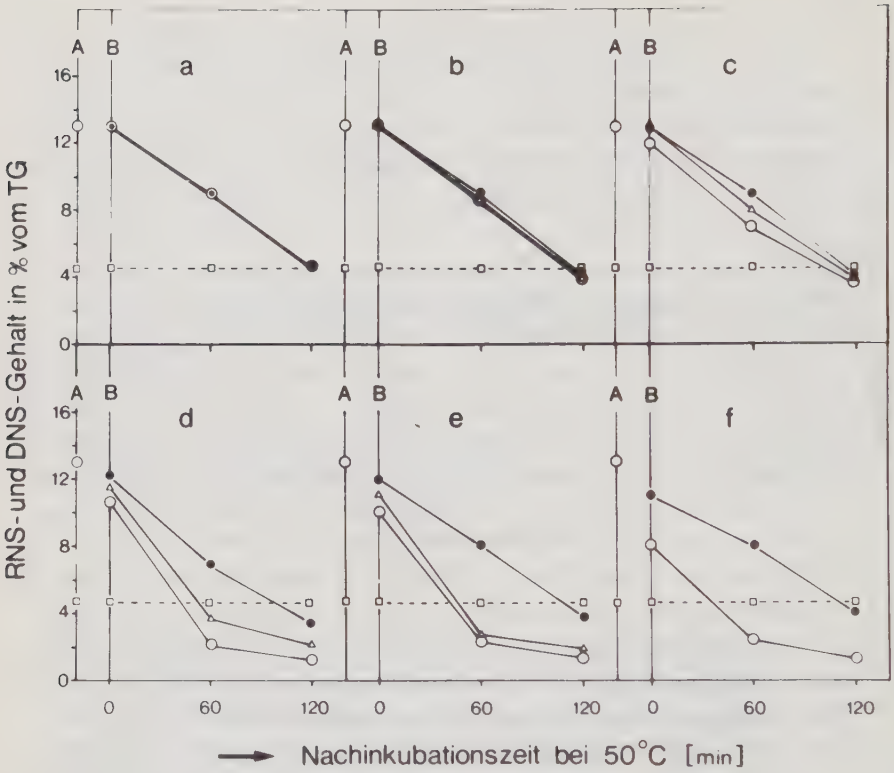


Abb. 6: Einfluß der Temperatur und der Dauer der Hitzeschockvorbehandlung auf den Gehalt der Zellen an RNS und DNS. Die Zellen wurden 10 sec, 5 und 10 min verschiedenen Temperaturen (a bei 45°C, b bei 50°C, c bei 60°C, d bei 65°C, e bei 70°C und f bei 80°C) ausgesetzt und 0, 60 und 120 min bei 50°C nachinkubiert. Der Gehalt an RNS und DNS wurde in den durch Zentrifugation abgetrennten Zellen wie unter Methoden angegeben bestimmt. A: RNS- und DNS-Gehalt der Zellen ohne Hitzebehandlung, B: RNS- und DNS-Gehalt nach der Hitzeschockbehandlung und zur Zeit 0 Nachinkubation bei 50°C. Verlauf des RNS-Gehaltes in % vom TG während der Nachinkubation bei den Proben mit einer Hitzeschockbehandlung für

●——● 10 sec,
△——△ 5 min,
○——○ 10 min,
□---□ DNS-Gehalt bei allen Proben (konstant geblieben).

2. RNS-Gehaltveränderung:

Durch die Hitzebehandlung wurde der RNS-Gehalt bei den verschieden behandelten Zellen stark herabgesetzt (Abbildung 6). Der höchste Effekt zur Erniedrigung des RNS-Gehaltes wurde erbracht, als die Zellen für 10 min bei Temperaturen über 65°C Hitzeschock-behandelt worden waren und anschließend 2 Std. bei 50°C inkubiert wurden (Abbildung 6 d, e und f). Kürzere Hitzeschockbehandlungen aber auch Hitzeschockbehandlung bei niedrigen Temperaturen (<65°C) für längere Dauer (10 min) waren bezüglich des RNS-Abbaues weniger effektiv.

Im allgemeinen konnte nach zweistündiger Inkubation bei 50°C, wenn die Hitzeschockbehandlung bei einer günstigen Temperatur (z.B. 65°C) durchgeführt wurde, eine Erniedrigung des RNS-Gehaltes von über 13% vom TG auf etwa 1 - 1,5% bei 10 min, 2 - 2,5% bei 5 min und 3 - 4% bei 10 sec Hitzeschockzeitdauer erzielt werden. Weiterhin war die RNS-Abbaugeschwindigkeit in der ersten Nachinkubationsstunde (bei 50°C), wenn die Proben 10 min Hitzeschock bei relativ höheren Temperaturen (>65°C) behandelt worden waren, verhältnismäßig höher als die in der nachfolgenden Inkubationszeit bei der gleichen Temperatur. Diese Resultate stimmen mit Extinktionswerten (Ext. 260 nm) der ausgeschiedenen Nukleinsäureabbauprodukte überein, die vorher unter vergleichbaren Bedingungen ermittelt worden waren (vgl. Abbildung 3).

Anhand der vorigen Ergebnisse konnte für den Nukleinsäureabbau (vor allem RNS-Abbau) in Hydrogenomonas-Zellen ein Hitzebehandlungsverfahren angewandt werden,welches eine Beseitigung von über 90% des gesamten RNS-Gehaltes in Hydrogenomonas-Zellen bewirkte, ohne jedoch den Proteingehalt irgend wie zu verringern.

Die einzelnen Verfahrensschritte sind folgende:

1. Hitzeschockbehandlung für 10 min bei 65°C.
2. Hitzenachinkubation für die Dauer von 2 Std. bei 50°C.

3. Enzymaktivität der Nukleasen bei PHB⁻4-Bakterien

Arbeiten an Hefen von OHTA et al. (1971) hatten ergeben, daß die Hitzeschockbehandlung bei einer erhöhten Temperatur eine Aktivierung von Hydrolyseenzymen auslöst. Durch eine Nachinkubation bei mittleren Temperaturen kam es zur Hydrolyse der RNS und zur Ausscheidung von deren Abbauprodukten. Einige Mechanismen, die an der Auslösung (Aktivierung) der endogenen Nukleasen möglicherweise beteiligt sind, wurden bereits von IMADA et al. (1972b) bei Candida lipolytica ermittelt.

Den vorangehenden Versuchen bei Stamm PHB⁻4 war zu entnehmen, daß durch eine optimale Hitzebehandlung über 90% der in den Zellen enthaltenen RNS entfernt werden können. Die Ursachen für den hohen RNS-Verlust sollten durch enzymatische Untersuchungen festgestellt werden. Es wurde also geprüft, wie sich die Hitzeschockbehandlung bei 65°C auf die Aktivität der endogenen Nukleasen und deren Veränderung während einer 2 - 3stündigen Nachinkubation bei 50 - 55°C auswirkt. In die Untersuchung wurden auch Enzyme einbezogen, die möglicherweise die primären Abbauprodukte der Nukleinsäuren weiter verändern: RNase, alkalische Phosphatase, Phosphodiesterase und DNase.

3.1. Optimierung der enzymatischen Testbedingungen der Nukleasen

Die für die Messung der Enzyme angegebenen Meßverfahren sind

an bestimmten, aus tierischen Organen, Hefen oder Bakterienzellen isolierten Enzymen ausgearbeitet worden. Da sich die Enzyme von Organismus zu Organismus unterscheiden, sind für die Bestimmung der Enzymaktivität die Verfahren jeweils zu überprüfen, insbesondere hinsichtlich eines zeitlich linearen Reaktionsablaufes, des Bestehens einer linearen Abhängigkeit zwischen eingesetzter Enzymmenge und Reaktionsrate sowie der Abhängigkeit von pH-Wert, Temperatur, Salz- und Ionenkonzentration und von anderen Milieufaktoren.

Die vorbereiteten Untersuchungen an RNase wurden an Extrakten aus Zellen durchgeführt, die vorher einer Hitzeschockbehandlung (10 min bei 65°C) und einer Nachinkubation (2 Std. bei 50°C) unterzogen worden waren.

Nach der Hitzebehandlung und vor dem Aufschließen der Zellen wurden die Zellen zur Entfernung von NS-Abbauprodukten zweimal mit einer Pufferlösung (20 mM Tris-HCl; pH = 7.2) gewaschen und anschließend in deren gleichen Puffer resuspendiert. Die enzymatischen Vorversuche für alkalische Phosphatase, Phosphodiesterase und DNase wurden mit Extrakten aus gefriergetrockneten, nicht hitzebehandelten Zellen durchgeführt.

3.1.1. Optimierung der enzymatischen Testbedingungen für RNase

Da festgestellt werden konnte, daß sowohl bei dem Gebrauch von gefriergetrockneten als auch von frischen PHB$^-$4-Zellen keine Aktivitätsunterschiede bei RNase auftraten (s. Anhang 3.), wurden im weiteren Verlauf der Enzymteste nur noch Extrakte aus gefriergetrockneten Zellen 50 mg TG/ml Zellsuspension nach einer Hitzebehandlung eingesetzt.

3.1.1.1. Zeitabhängigkeit der RNase-Reaktion im Enzymtest

Voraussetzung für die Messung der Aktivität eines Enzyms ist die Möglichkeit, einen geradlinigen Verlauf des Fortschreitens der Reaktion zu verfolgen; Ermittlung der Linearität zwischen der Reaktionsrate und der Enzym-Substrat-Inkubationszeit. Für die Bestimmung der Zeitabhängigkeit der RNase-Reaktion wurden gleiche Testansätze vorbereitet. Bei den einzelnen Ansätzen wurde nach bestimmten Zeiten die Enzym-Reaktion abgestoppt und - wie in Methoden angegeben - die Menge des Abbauproduktes bestimmt. Während der Reaktionszeit von 0 bis 180 min schritt die Reaktion ($\Delta E_{260\ nm}$ von 0,13 bis 1,56 je 0,4 ml RE entsprechend 2,8 mg Protein je 2 ml Ges. Ansatz) mit der Inkubationszeit linear voran (Abbildung 7a). Aufgrund der strengen Zeitlinearität ist die Inkubationszeit für den Endpunkt der Enzym-Reaktion innerhalb 3 Std. beliebig wählbar. Zur routinemäßigen Aktivitätsmessung wurde als Enzymeinheit die Extinktionsveränderung bei 260 nm von 0,01 in der Zeit von 0 bis 60 min Inkubation bei 37°C festgesetzt.

3.1.1.2. Abhängigkeit von der eingesetzten Rohextraktmenge

Eine zweite wesentliche Voraussetzung für die Bestimmung der Enzymaktivität ist das Bestehen einer Linearität zwischen der Reaktionsrate und der eingesetzten Konzentration an Extrakt (Enzym). Um diesen Sachverhalt bei der RNase im Extrakt zu überprüfen, wurden die Extraktmengen zwischen 0,1 und 0,8 ml entsprechend 0,7 und 5,6 mg Protein im Ansatz verändert. Der Enzymtest wurde für die einzelnen Ansätze wie unter Methoden angegeben durchgeführt. Die RNase-Aktivität (Δ E 260 nm) war der Extraktmenge nach 60 min Enzym-Reaktion bei 37°C je 2 ml Testprobe proportional (Abbildung 7b). Somit konnte eine beliebige Extraktmenge zwischen 0,1 und 0,8 ml eines Extraktes der hitzebehandelten Zellen eingesetzt werden.

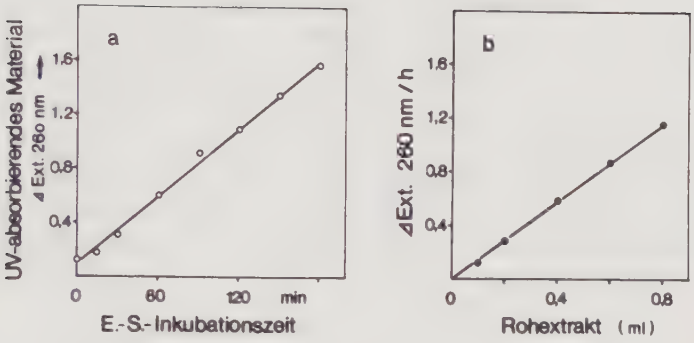


Abb. 7: Bestimmung der Aktivität der RNase

a. Abhängigkeit des während der RNase-Einwirkung auf RNS freigesetzten mit Uranylacetat-Perchlorsäure nicht füllbaren, UV-absorbierenden Materials von der Zeit der Enzym-Substrat-Inkubation bei 37°C.

b. Abhängigkeit der Aktivität der RNase von der eingesetzten Konzentration an Zell-Rohextrakt, gemessen an der in 60 min bei 37°C gebildeten Menge des bei 260 nm (ΔExt. 260) absorbierenden Materials.

3.1.1.3. Ermittlung des pH-Optimums im Enzymtest

Die katalytische Aktivität der meisten Enzyme ist pH-abhängig. Bei RNase wurde die Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert ermittelt. Die Bestimmung der pH-Optima wurde mit 0,05 M Tris-HCl-Puffer, 0,02 M $MgSO_4$ im pH-Bereich von 3,8 bis 10,2 (in Pufferlösung), entsprechend 4 bis 9 (im Testansatz) durchgeführt, vorausgesetzt, daß der pH-Wert der RNS-Lösung bzw. des Rohextraktes zwischen pH 7 und 7,4 vorlag. Nach der Aktivitätsmessung bei den einzelnen Testproben lagen die pH-Optima zwischen pH 7,4 und 7,6 im Testansatz (gemessen durch pH-Glaselektrode) entsprechend 7.6 und 8 pH in der angewandten Pufferlösung (Abbildung 8).

3.1.1.4. Temperatur-Optima der RNase-Aktivität

Die Geschwindigkeit jeder enzymatischen Reaktion wird durch die Temperatur beeinflußt. Routinemäßig wurden die Prüfungen der Aktivität der RNase bei 37°C durchgeführt. Zur Ermittlung der Temperatur-Optima wurden die Testansätze im Bereich von 20 bis 70°C für 60 min inkubiert. Wie in Abbildung 9 dargestellt, stieg die spezifische Aktivität (E/mg Protein) relativ schnell an, erreichte bei 50 - 55°C das Optimum und fiel danach steil ab. Die Aktivität bei 50 - 55°C war um das Doppelte höher als bei 37°C.

3.1.1.5. Ermittlung der geeigneten Pufferlösung für den Testansatz der RNase

Zur Ermittlung der geeigneten Pufferlösung für den RNase-Ansatz wurden drei verschiedene Puffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM K-Acetat und 50 mM K-Phosphat) einmal in Abwesenheit von Mg-Ionen und die anderen mit Mg-Ionen eingesetzt.

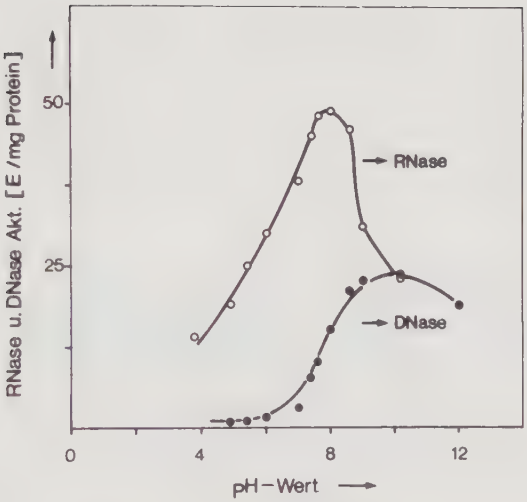


Abb. 8: pH-Optimum der durch Hitzebehandlung aktivierten RNase und der DNase von nicht hitzebehandelten Zellen.

○——○ RNase-Aktivität (E/mg Protein),
●——● DNase-Aktivität (E/mg Protein).

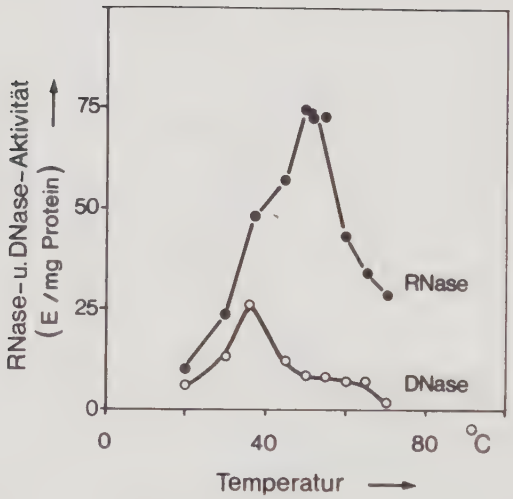


Abb. 9: Abhängigkeit der Aktivitäten der RNase und DNase von der Temperatur.

●——● RNase-Aktivität (E/mg Protein),
○——○ DNase-Aktivität (E/mg Protein).

Wie in Abbildung 10a dargestellt, zeigte die K-Phosphat-Pufferlösung wie im Falle der Abwesenheit von Mg-Ionen relativ höhere RNase-Aktivität (E/mg Protein) als die anderen Pufferlösungen. Durch Zusatz von Mg-Ionen wurde die Aktivität der RNase (E/mg Protein) bei den Pufferlösungen Tris-HCl und K-Acetat stark erhöht. Die Ursache für den geringen Anstieg der Enzymaktivität bei K-Phosphat liegt an der Bindung von Mg-Ionen durch den Phosphatpuffer. Diese Resultate zeigten wie auch die folgenden, daß die Mg-Ionen die RNase-Aktivität begünstigen. Für routinemäßige Durchführung des Enzymtestes wurde eine 50 mM Tris-HCl Pufferlösung mit 20 mM $MgSO_4$ angewandt.

3.1.1.6. Einfluß einiger einwertiger (Na^+ und K^+) bzw. zweiwertiger Ionen (Mg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+} und Zn^{2+}) auf die RNase-Aktivität

Die Einwirkung der oben genannten Ionen auf die RNase-Aktivität wurde mit entsalzten Extrakten aus hitzebehandelten Zellen ausgeführt. Die Salze wurden den geeigneten Pufferlösungen in den Konzentrationen von 0,1 bis 1,0 M für K- und Na-Salze; von 10 bis 100 mM für Mg-, Ca-Salze; von 2 bis 20 mM für Mn-, Co- und Zn-Salze zugesetzt. Bei K-, Na-, Ca-, Mg-Salzen wurde Tris-HCl (50 mM) als Puffer angewandt. Bei Co-, Mn- und Zn-Salzen wurde K-Acetat (50 mM) als Puffer verwendet, Tris-HCl-Puffer konnte hierbei wegen Ausfällungen nicht verwendet werden. Die spezifische Enzymaktivität der RNase bei den verschiedenen Salzkonzentrationen der einzelnen Salze wurde graphisch gegen die Enzymaktivität bei einer Pufferlösung ohne Salze aufgetragen (Abbildung 11). Diese Versuche hatten die folgenden Ergebnisse:

a. Mg^{2+}-Ionen; die Enzymaktivität war am höchsten bei der Verwendung von Mg^{2+}-Ionen. Sie erreichte bei Konzentrationen zwischen 20 mM und 50 mM in der Pufferlösung ein Optimum und fiel bei höheren Konzentrationen leicht ab. Eine hemmende Wirkung konnte nicht festgestellt werden.

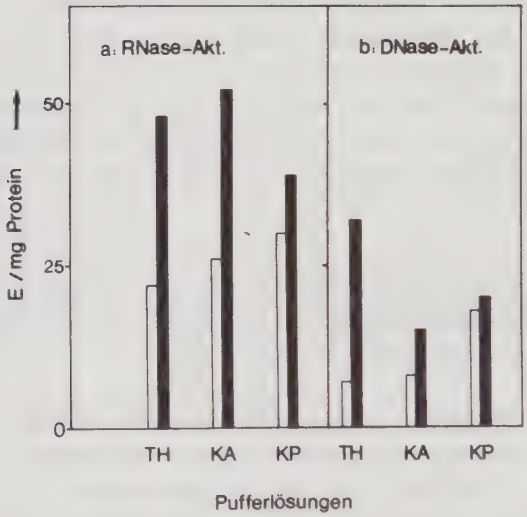


Abb. 10: Vergleich verschiedener Pufferlösungen bezüglich der Aktivität (E/mg Protein) der RNase (a) und der DNase (b).

Pufferlösungen TH: Tris-HCl (0,05 M), KA: Kalium-Acetat (0,05 M), KP: K-Phosphat (0,05 M).
pH-Wert der Pufferlösungen für die Bestimmung der RNase-Aktivität lag bei pH 8, für die DNase bei pH 10.

■ Pufferlösungen mit Mg^{2+}-Ionen (0,02 M $MgSO_4$),

□ Pufferlösungen ohne Mg^{2+}-Ionen.

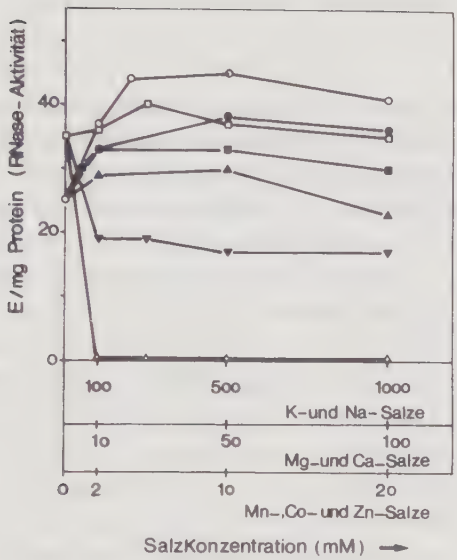


Abb. 11: Abhängigkeit der Aktivität der RNase (E/mg Protein) von der Anwesenheit und Konzentration von Kationen. Die angegebenen Konzentrationen (mM) in Text und Abbildung geben die Konzentration der Salze in den Pufferlösungen wider. Jeder Testansatz von 1 ml besteht aus 0,4 ml Puffer, 0,2 ml Substrat (2%ige RNS) und 0,4 ml Rohextrakt, so daß die tatsächliche Salz-Konzentration im Testansatz nur 40% der eingesetzten Salzkonzentration in den Pufferlösungen ausmacht. Verlauf der RNase-Aktivität bei den Salzen:

○——○ $MgSO_4$,
●——● KCl,
□——□ $MnCl_2$,
■——■ NaCl,
▲——▲ $CaCl_2$,
▼——▼ $CoCl_2$,
△——△ $ZnSO_4$.

b. Ca^{2+}-Ionen; sie bewirken bei geringer Konzentration (10 mM $CaCl_2$ in der Pufferlösung) eine leichte Enzymaktivierung, bei erhöhter Konzentration (100 mM $CaCl_2$) dagegen eine Aktivitätshemmung.

c. K^+- und Na^+-Ionen; die Salze dieser Ionen bewirkten in einer Konzentration von 50 mM bis 1000 mM eines Salzes in der Pufferlösung eine leichte Enzymaktivierung. Allerdings fiel die Aktivität bei einer Konzentration von 500 mM KCl bzw. von 100 mM NaCl in der Pufferlösung leicht ab. Eine Aktivitätshemmung unter den angegebenen Konzentrationen konnte nicht festgestellt werden.

d. Mn^{2+}-Ionen; im allgemeinen zeigte sich in dem Bereich von 2 - 10 mM $MnSO_4$ in der Pufferlösung eine leichte Enzymaktivierung. Die Enzymaktivität besaß ihr Optimum bei der Anwendung von 5 mM $MnSO_4$ in der Pufferlösung. Bei höheren Konzentrationen konnte ein Abfall der Aktivität gemessen werden, wie sie bei einer Pufferlösung ohne Zusatz von Salzen gegeben war.

e. Co^{2+}- und Zn^{2+}-Ionen; bei beiden Salzen in dem Bereich von 2 - 20 mM Salzkonzentration in der Pufferlösung trat eine Aktivitätshemmung der RNase auf. Am stärksten wurde die RNase durch Zn^{2+}-Ionen gehemmt, ihre Aktivität entsprach dem Nullwert.

3.1.2. Optimierung der enzymatischen Testbedingungen für Alkalische Phosphatase

Es wurde die Methode von NAKAO et al. (1968) in modifizierter Form angewandt. Hier wurde nur die Abhängigkeit der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase von Zeit der Inkubation bzw. von der eingesetzten Extraktmenge bestimmt.

3.1.2.1. Zeitabhängigkeit der Reaktion der Alkalischen Phosphate

Anhand gleicher Testansätze wurde die Enzymaktivität der Alkalischen Phosphate bestimmt (Methode). Bei den einzelnen Ansätzen wurde die Reaktion nach bestimmten Zeitintervallen abgestoppt und die Menge der gebildeten Reaktionsprodukte bei der Wellenlänge 400 nm bestimmt. Im Verlauf von 0 bis 120 min E.-S.-Inkubation schritt die Reaktion des Enzyms (ΔE 400 nm von 0 bis 2.6 je 0,1 ml RE entsprechend 1,75 mg Protein je 2 ml Ansatzprobe) mit der Inkubationszeit linear voran (Abbildung 12a). Im Bereich der Linearität wurde zur routinemäßigen Enzymaktivitätsbestimmung die Extinktionsveränderung (ΔE 400 nm von 0,1) nach 30 min Inkubation bei 37°C als Enzymeinheit (E) festgesetzt.

3.1.2.2. Abhängigkeit von der Extraktmenge

Zur Ermittlung der Abhängigkeit zwischen der Reaktionsrate des Enzyms und der eingesetzten Extraktmenge wurden verschiedene Extraktmengen (0,1 bis 0,7 ml RE entsprechend 1,75 - 12,25 mg Protein) je Ansatz angewandt. Der Enzymtest wurde für die einzelnen Ansätze wie unter Methoden angegeben durchgeführt. Die Reaktionsrate der Alkalischen Phosphate (ΔE 400 nm) war der Extraktmenge nach 30 min Inkubation bei 37°C je 2 ml Testprobe proportional (Abbildung 12b). Somit konnte eine beliebige Extraktmenge mit etwa 2 bis 12 mg Protein je Testansatz verwendet werden.

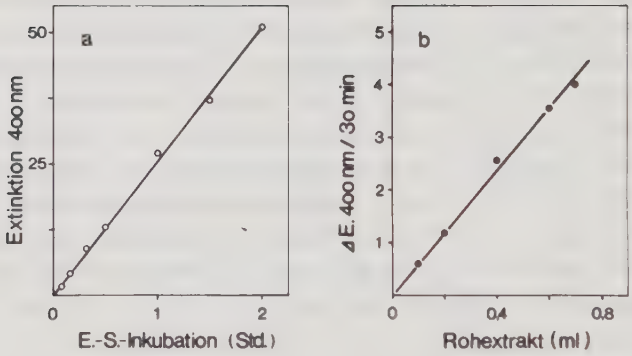


Abb. 12: Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase

a. Abhängigkeit des durch den Rohextrakt gespaltenen Enzymsubstrats von der Zeit. Die Reaktion des Enzyms, gemessen an der Extinktionsveränderung bei 400 nm, wurde innerhalb von 2 Std. verfolgt.

b. Abhängigkeit der Reaktionsrate von der eingesetzten Konzentration an Rohextrakt. Die Reaktionsrate wurde anhand der Extinktionsveränderung (ΔE. 400 nm) während 30 min Inkubation für die verschiedenen Konzentrationen vom Rohextrakt verfolgt.

3.1.3. Optimierung der enzymatischen Testbedingungen für Phosphodiesterase

Auch hier wurde die Methode von NAKAO et al. (1968) in abgewandelter Form angewandt, wobei eine Veränderung des Testgemisches vorgenommen wurde. Dabei wurde die Abhängigkeit der Phosphodiesterase-Aktivität von der Zeit der Inkubation bzw. von der eingesetzten Extraktmenge bestimmt.

3.1.3.1. Zeitabhängigkeit der Reaktion der Phosphodiesterase

Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Reaktionsrate der Phosphodiesterase von der Inkubationszeit wurden gleiche Ansätze angewandt (Methode). Nach bestimmten Zeitintervallen wurde die Enzymreaktion bei den einzelnen Testansätzen abgestoppt. Die Enzymaktivität wurde in den Testproben bei der Wellenlänge 400 nm bestimmt. Im Verlauf von 0 bis 6 Std. Inkubation schritt die Reaktion des Enzyms (Δ E 400 nm von 0,08 bis 2,9 je 0,25 ml RE entsprechend 4,4 mg Protein je 2 ml Testprobe) mit der Inkubationszeit linear voran (Abbildung 13a). Im Linearitätsbereich wurde zur routinemäßigen Enzymaktivitätsbestimmung die Extinktionsveränderung (ΔE 400 nm) von 0,1 nach 5 Std. Inkubation bei 37°C als Enzymeinheit (E) festgesetzt.

3.1.3.2. Abhängigkeit von der eingesetzten Extraktmenge

Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Reaktionsrate des Enzyms von der eingesetzten Extraktmenge wurden die Extraktmengen (von 0,1 bis 0,4 ml RE entsprechend 1,75 bis 7,0 mg Protein) je Ansatzprobe angewandt. Der Enzymtest wurde für die einzelnen Testansätze, wie bereits unter Methoden angegeben, durch-

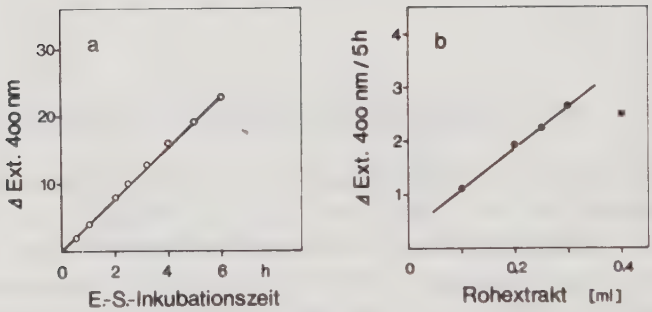


Abb. 13: Prüfung der Aktivität der Phosphodiesterase
a. Abhängigkeit der Menge des freigesetzten Produkts, gemessen an der Extinktionsveränderung (Δ Ext. 400 nm) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit bei 37°C.

b. Abhängigkeit der Reaktionsrate (Δ Ext. 400 nm/ 5 Std.) von der Konzentration an eingesetztem Rohextrakt.

geführt. Die Reaktionsrate (ΔE 400 nm) war bis zu einer Extraktmenge von 0,3 ml Rohextrakt entsprechend 5,25 mg Protein je 2 ml Testprobe proportional (Abbildung 13b). Zu routinemäßigen enzymatischen Tests konnte eine Extraktmenge mit etwa 2 bis 5 mg Protein für jede Ansatzprobe zugesetzt werden.

3.1.4. Optimierung der enzymatischen Testbedingungen für DNase

3.1.4.1. Zeitabhängigkeit der DNase-Reaktion im Enzymtest

Zur Ermittlung der Abhängigkeit der DNase-Reaktion von der Inkubationszeit im Enzymtest wurden die gleichen Ansätze angewandt. Bei den einzelnen Ansätzen wurde nach bestimmten Zeitintervallen die Enzymreaktion abgestoppt und die Extinktion der Reaktionsprodukte bei der Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Im Bereich von 0 bis 60 min Inkubation war die Reaktionsrate der DNase (ΔE 260 nm von 0,24 bis 1,6 je 0,4 ml RE entsprechend 14 mg Protein je 2 ml Testprobe) mit der Inkubationszeit linear vorangeschritten. Nach 60 min Inkubation zerstreuten sich die Extinktionswerte, so daß eine Linearität nicht erfaßbar war (Abbildung 14a). Zur routinemäßigen Durchführung der enzymatischen Tests wurde die Extinktionsveränderung von 0,01 in der Zeit von 0 bis 60 min Inkubation bei 37°C als Enzymeinheit (E) festgesetzt.

3.1.4.2. Abhängigkeit von der eingesetzten Extraktmenge

Zur Ermittlung der Abhängigkeit zwischen der Reaktionsrate der DNase und der eingesetzten Extraktmenge wurden verschiedene Extraktmengen (von 0,1 bis 0,8 ml RE entsprechend 3,5

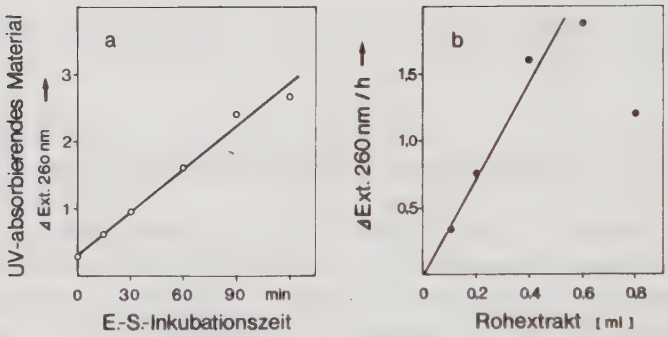


Abb. 14: Bestimmung der Aktivität der DNase.
a. Abhängigkeit der Menge der gespaltenen DNS, gemessen anhand des freigesetzten und UV-absorbierenden Materials bei 260 nm von der Inkubationszeit (0 bis 120 min) bei 37°C.

b. Abhängigkeit der Reaktionsrate (ΔE 260 nm/h) von der Konzentration am eingesetzten Rohextrakt aus nicht hitzebehandelten Zellen.

bis 28 mg Protein) je Ansatz verwendet. Der Enzymtest wurde für die einzelnen Ansätze, wie bereits unter Methoden angegeben, durchgeführt. Die Reaktionsrate (ΔE 260 nm) war bis zu einer Extraktmenge von 0,6 ml RE entsprechend 21 mg Protein je 2 ml Testprobe relativ proportional (Abbildung 14b). Für enzymatische Tests konnte eine beliebige Extraktmenge zwischen 0,1 ml und 0,4 entsprechend 3,5 und 14 mg Proteingehalt eines Extraktes der Zellen ohne Hitzebehandlung verwendet werden.

3.1.4.3. Ermittlung des pH-Optimums im Enzym-Test

Die Ermittlung der pH-Optima der DNase wurde mit 0,05 M Tris-HCl-Puffer; 0,02 M $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ im pH-Bereich von 3,8 bis 12 (in Pufferlösung), entsprechend 4 bis >11 (im Testansatz) durchgeführt; vorausgesetzt, daß der pH-Wert der DNS-Lösung bzw. des Rohextraktes zwischen 7 und 7,4 war. Die Aktivitätsbestimmung der einzelnen Testproben ergab ein pH-Optima bei dem pH-Bereich zwischen 9,5 und 10,5 pH der eingesetzten Pufferlösung (Abbildung 8), danach fiel die DNase-Aktivität steil ab.

3.1.4.4. Temperatur-Optimum der DNase-Aktivität

Zur Ermittlung der optimalen Temperatur für die DNase-Aktivität wurden die gleichen Ansätze (s. Methoden) bei verschiedenen Temperaturen im Bereich von 20 bis 70°C für 60 min inkubiert. Wie in Abbildung 9 dargestellt, erreichte die DNase-Aktivität (E/mg Protein) bei 37°C ihres Optimums und fiel danach sehr stark ab, so daß sie bei 70°C ihren niedrigsten Wert erreicht hatte.

3.1.4.5. Ermittlung der geeigneten Pufferlösung für den Testansatz der DNase

Zur Ermittlung der geeigneten Pufferlösung wurden auch hier die gleichen Pufferlösungen verwendet, die bereits bei der RNase angewandt worden waren. Der pH-Wert der einzelnen Pufferlösungen wurde jedoch statt 8 auf 10 pH erhöht. Wie in Abbildung 10b dargestellt, begünstigte wiederum die K-Phosphat-Pufferlösung im Falle ohne Mg-Ionen die Enzymaktivität als den übrigen Pufferlösungen. Durch den Zusatz von Mg^{2+}-Ionen wurde die Enzymaktivität (E/mg Protein) bei Tris-HCl-Puffer stark erhöht, der den doppelten Wert ergab als die übrigen Pufferlösungen. Für eine routinemäßige Enzymtest-Durchführung wurde 50 mM Tris-HCl-Pufferlösung; 20 mM $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$; pH = 10 angewandt.

3.1.4.6. Einfluß einiger einwertiger (Na^+, K^+) bzw. zweiwertiger Ionen (Mg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+} und Zn^{2+}) auf die DNase-Aktivität

Zur Ermittlung der Einwirkung der oben genannten Ionen wurde ein entsalztes Extrakt aus unbehandelten Zellen verwendet. Die oben genannten Salze wurden den Pufferlösungen in gleichen Konzentrationen verabreicht, wie sie für die RNase schon beschrieben worden waren. Die Pufferlösungen besaßen da allerdings einen höheren pH-Wert (pH = 10).

Die spezifische Aktivität der DNase bei den verschiedenen Salzkonzentrationen der einzelnen Salze wurde graphisch gegen die Enzymaktivität bei einer Pufferlösung ohne Salze aufgetragen (Abbildung 15). Diese Versuche ergaben folgende Resultate:

a. Mg^{2+}-Ionen; die Enzymaktivität der DNase war am höchsten

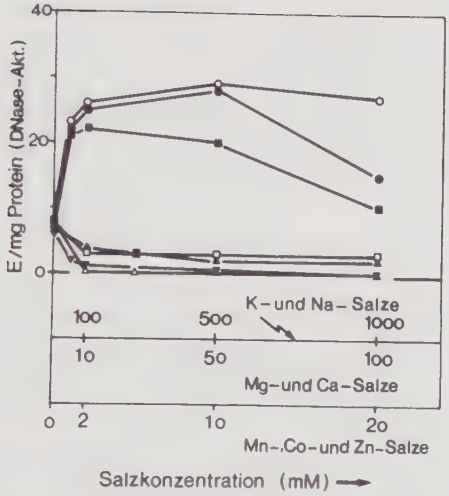


Abb. 15: Wirkung von Metallionen auf die Aktivität der DNase (E/mg Protein) im Rohextrakt von nicht-hitzebehandelten Zellen. Die angegebenen Salzkonzentrationen in Text und Abbildung geben die Konzentration der Salze in der Pufferlösung wider, so daß die tatsächliche Konzentration im Testansatz (1 ml aus 0,4 ml Puffer, 0,2 ml Substrat und 0,4 ml Rohextrakt) nur 40% der eingesetzten Salzkonzentration in der Pufferlösung ausmacht. Verlauf der Aktivität der DNase bei den Salzen:

○——○ $MgSO_4$,
●——● KCl,
■——■ NaCl,
□——□ $MnCl_2$,
▲——▲ $CoCl_2$,
▼——▼ $CaCl_2$,
△——△ $ZnSO_4$.

bei dem Zusatz von Mg^{2+}-Ionen. Sie erreichte bei Konzentrationen von 50 mM in der Pufferlösung ein Optimum und fiel bei erhöhter Konzentration (100 mM $MgSO_4$ in der Pufferlösung) langsam zurück. Eine Aktivitätshemmung wurde nicht festgestellt.

b. K^+-Ionen; die DNase-Aktivität erhöhte sich schnell bei der Verwendung von KCl bis zu einer Salzkonzentration von 100 mM in der Pufferlösung. Es erfolgte eine langsame Aktivitätssteigerung bis ein Optimum (bei 500 mM Salzkonzentration in dem Puffer) erreicht wurde; danach fiel die Aktivität relativ schnell ab; eine Hemmung ist jedoch nicht zustande gekommen.

c. Na^+-Ionen; hier auch begünstigten die Na^+-Ionen die DNase-Aktivität, jedoch in geringerem Maße als bei Mg^{2+}- oder K^+-Ionen. Eine maximale Aktivität wurde durch 100 mM NaCl in der Pufferlösung ermittelt, danach ist die DNase-Aktivität stark zurückgegangen,und zwar viel stärker als bei Mg^{2+}- und K^+-Ionen der Fall war. Eine Aktivitätshemmung trat in diesem Falle jedoch nicht ein.

d. Mn^{2+}-, Co^{2+}-, Ca^{2+}- und Zn^{2+}-Ionen; durch den Zusatz von Salzen dieser Ionen und sogar in geringeren Salzkonzentrationen wurde eine starke Aktivitätshemmung hervorgerufen. Am stärksten war die Hemmung der DNase-Aktivität durch den Zusatz von Zn^{2+}-Ionen verursacht worden.

3.2. Veränderung der Nukleaseaktivität während der Hitzebehandlung

Der Abbau der Ribonukleinsäure zu niedermolekularen Spaltstücken ist eine Folge der Aktivierung von Nukleasen. Die Aktivierung wird durch die Hitzeschockbehandlung ausgelöst.

Die vorangehenden Versuche hatten gezeigt, daß nach dem Hitzeschock die RNS abgebaut wird. Es sollte nun geprüft werden, ob die RNase-Aktivität während und nach der Hitzeschockbehandlung zunimmt oder ob der Abbau der RNS nur eine Folge einer teilweisen Denaturierung, eines Zusammenbruchs der Struktur und somit einer Art Autolyse ist. In letzterem Falle würde man keine Steigerung der RNase-Aktivität erwarten. Die folgenden Versuche hatten zum Ziele, die Veränderungen der Aktivität der Nukleasen von Stamm PHB^{-}4 nach verschieden langer Hitzeschockbehandlung bei 65°C während der dreistündigen Nachinkubation bei 50°C zu verfolgen. Dabei wurden die Zellen folgenden Behandlungen ausgesetzt:
Mehrere Proben zu je 6 ml einer 5%igen Zellsuspension (0,3 g TG Zellen/6 ml 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4) wurden in graduierten Zentrifugengläsern (1,5 x 10 cm) vorbereitet. Einige Proben blieben ohne Hitzebehandlung, die anderen wurden in vier Gruppen der Hitzebehandlung unterzogen.

Zur Hitzeschockbehandlung wurde jede Probe der 4 Gruppen für eine bestimmte Zeitdauer einer Temperatur von 65°C ausgesetzt, d.h. die erste Gruppe (5 Proben) wurde 10 sec, die zweite (4 Proben) für 1, die dritte (4 Proben) für 5 und die vierte Gruppe (5 Proben) für 10 min bei 65°C gehalten. Nach dem Erkalten wurden die Proben bei 50°C nachinkubiert. Nach 0, 30, 60, 120 und 180 min wurden die Proben der verschiedenen Gruppen aus dem Inkubationsbad entfernt, gekühlt und bei 5000 U/min für ca. 30 min abzentrifugiert. Zur Entfernung von NS-Abbauprodukten wurden die Zellen zweimal gewaschen und jede Probe anschließend mit dem gleichen Puffer auf 6 ml aufgefüllt, resuspendiert und bei 0°C aufbewahrt.

Aus diesen Zellsuspensionen wurden Rohextrakte hergestellt wie unter Methoden (Methode 8) angegeben. An diesen Rohextrakten wurde die Aktivität der Nukleasen bestimmt.

Die Bestimmung der einzelnen Nukleasen (RNase, Alkalische Phosphatase, Phosphodiesterase und DNase) wurde, wie unter

Methoden (7.2.) bereits angegeben, durchgeführt. Die Enzymaktivitäten wurden gegen die Dauer der Hitzebehandlung (sowohl direkt nach dem Hitzeschock als auch im Laufe der Nachinkubation bei 50°C) aufgetragen. Auch die Enzymaktivität in den Extrakten der unbehandelten Zellen wurde graphisch dargestellt. In den Darstellungen sind die absoluten und spezifischen Aktivitäten angegeben, die im Überstehenden nach der Abzentrifugation der Zelltrümmer ermittelt wurden. Die absolute Aktivität gibt die auf das Trockengewicht der angesetzten Zellen bezogene Aktivität an. Die spezifische Aktivität ist wie üblich in E je mg Protein im Überstehenden angegeben. Beide Aktivitäten unterscheiden sich in nennenswerter Masse. Diese Unterschiede sind darauf zurückzuführen, daß während der Hitzebehandlung der Zellen bereits ein Teil der Proteine denaturiert wird und nach der Zentrifugation nach dem Zellaufschluß in Sediment gelangt.

Die oben genannten Versuche und ihre Auswertung führten zu folgenden Ergebnissen:

3.2.1. Veränderung der RNase-Aktivität

Wie aus Abbildung 16 hervorgeht, unterliegt die Aktivität der RNase (E/mg Protein) erheblichen Veränderungen. Während die RNase-Aktivität unbehandelter Zellen etwa 10 E/mg Protein betrug, hatte die Aktivität nach der 10 min langen Hitzeschockbehandlung bereits den doppelten Wert erreicht. Im Laufe von 2 Std. Nachinkubation bei 50°C stieg die Aktivität dann auf 50 E/mg Protein an. Kürzere Hitzeschocks hatten eine erheblich geringere Aktivitätssteigerung zur Folge. Wie für die Freisetzung von UV-absorbierendem Material optimalen Bedingungen waren also auch die für die RNase-Aktivierung günstig. Ob durch die Anwendung einer noch höheren Temperatur bei variierter Dauer eine weitere Steigerung der RNase-Aktivität möglich ist, wurde nicht geprüft.

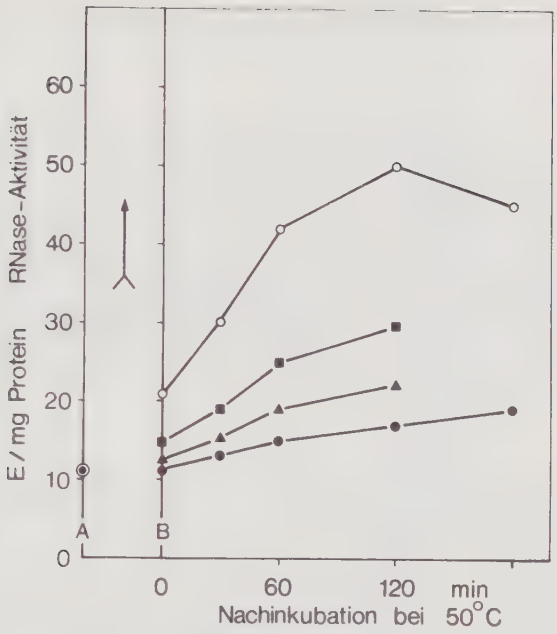


Abb. 16: Veränderung der Aktivität der RNase während der Hitzebehandlung.
Im Rohextrakt der nicht-hitzebehandelten Zellen (A) bzw. der verschiedenen hitzebehandelten Zellen (B); Hitzeschock bei 65°C für die Dauer von 10 sec, 1, 5 und 10 min mit nachfolgender Nachinkubation bei 50°C für die Zeit 0, 30, 60, 120 und 180 min wurde die Aktivität der RNase (E/mg Protein) gemessen. Die Aktivitätsmessung wurde wie unter Methode 7.2.1. schon beschrieben durchgeführt.
Symbole: Aktivität der RNase (E/mg Protein) im Rohextrakt der Zellen mit einer Hitzeschockbehandlung bei 65°C für

○——○ 10 min,
■——■ 5 min,
▲——▲ 1 min,
●——● 10 sec.

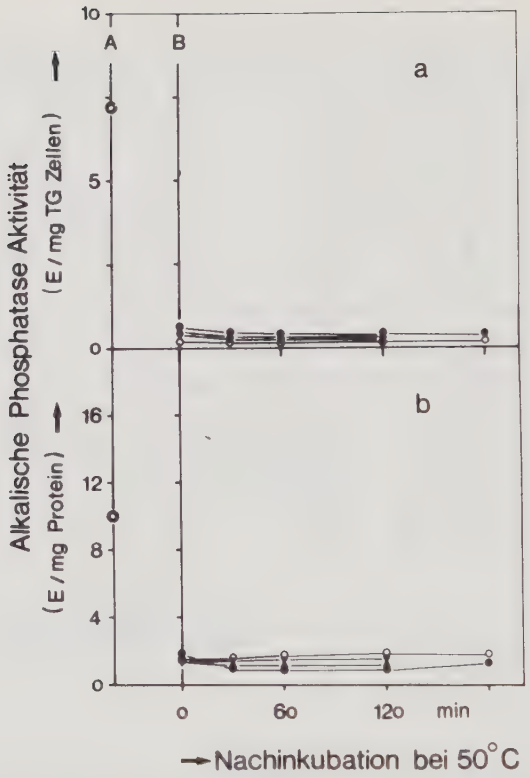


Abb. 17: Veränderung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase während der Hitzebehandlung. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase sowohl absolute(a) als auch spezifische (b) wurde im Rohextrakt der nicht-hitzebehandelten Zellen (A) bzw. im Rohextrakt der hitzebehandelten Zellen (B); Hitzeschockvorbehandlung bei 65°C für 10 sec, 1, 5 und 10 min mit einer Nachinkubation für die Dauer 0, 30, 60, 120 und 180 min, gemessen. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte wie unter Methoden (Methode 7.2.3.) angegeben.
Symbole: Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Rohextrakt der Zellen mit einer Hitzeschockvorbehandlung bei 65°C für

●——● 10 sec,
△——△ 1 min,
▼——▼ 5 min,
○——○ 10 min.

3.2.2. Veränderung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase sowohl die absolute (a) als auch die spezifische (b) wurde durch die Hitzeschockbehandlung erheblich vermindert, ganz gleich ob die Zellen der Temperatur von 65°C nur 10 sec oder 10 min ausgesetzt (Abbildung 17) waren. Während der dreistündigen Nachinkubation traten nahezu keine Veränderungen ein. Das Enzym als also als sehr hitzelabil anzusehen; ob es einer Induktion durch andere Milieufaktoren unterliegt, wurde nicht geprüft.

3.2.3. Veränderung der Aktivität der Phosphodiesterase

Wie die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde auch die der Phosphodiesterase (Abbildung 18) durch die Hitzeschockbehandlung beträchtlich vermindert. Allerdings war die Abnahme der Aktivität nicht so extrem. Auch stieg die Aktivität der 10 min bei 65°C vorbehandelten Proben während der Nachbehandlung bei 50°C wieder etwas an (Abbildung 18b).

3.2.4. Veränderung der Aktivität der DNase

Auch die Aktivität der DNase (Abbildung 19) bot ein von der RNase völlig verschiedenes Bild. Durch die Hitzeschockbehandlung wurde die Aktivität von 23 auf etwa 10 E/mg Protein herabgesetzt (Abbildung 19b). Während der Nachinkubation bei 50°C machte die spezifische Aktivität keine Veränderungen durch. Damit erwies sich die DNase als nicht-induzierbar durch den Hitzeschock. Diese Messungen machen es verständlich, daß während der Hitzebehandlung der Zellen kein Abbau von DNS zu beobachten war.

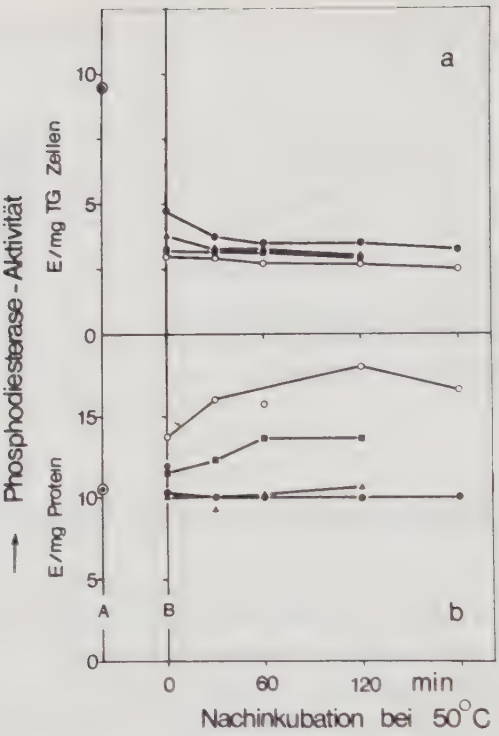


Abb. 18: Veränderung der Aktivität der Phosphodiesterase während der Hitzebehandlung. Im Rohextrakt der nichthitzebehandelten Zellen (A) und der hitzebehandelten Zellen (B); Hitzeschock bei 65°C für 10 sec, 1, 5 und 10 min nachfolgend mit einer 3stündigen Inkubation bei 50°C wurde die Aktivität der Phosphodiesterase sowohl die absolute (a) als auch die spezifische (b), wie unter Methode 7.2.4. angegeben wurde, gemessen.
Symbole: Aktivität der Phosphodiesterase im Rohextrakt der Zellen mit einer Hitzeschockbehandlung für die Dauer

●——●10 sec,
▲——▲ 1 min,
■——■ 5 min,
○——○10 min.

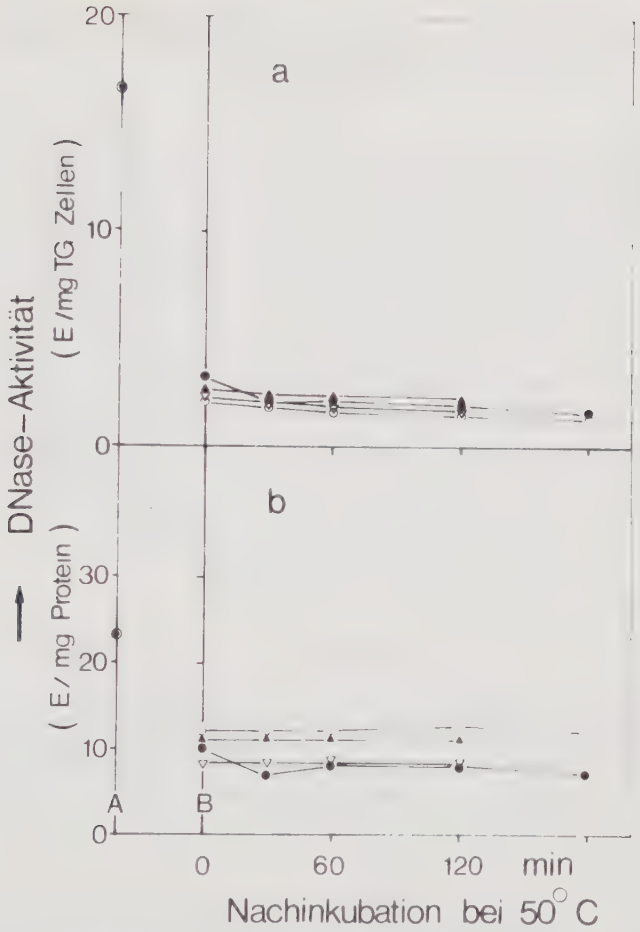


Abb. 19: Veränderung der DNase-Aktivität während der Hitzebehandlung. Die Aktivität der DNase - sowohl absolute (a) als auch spezifische (b) - würde im Rohextrakt der Zellen ohne Hitzebehandlung (A) sowie im Rohextrakt der hitzebehandelten Zellen (B); Hitzeschock bei 65°C für die Dauer 10 sec, 1, 5 und 10 min gefolgt mit einer Nachinkubation bei 50°C für die Zeit 0, 30, 60, 120 und 180 min gemessen. Die Aktivitätsbestimmung wurde, wie unter Methode 7.2.2. angegeben worden ist, durchgeführt. Symbole: Aktivität der DNase im Rohextrakt der Zellen mit einer Hitzeschockvorbehandlung für
o——o 10 min,
▲——▲ 5 min,
▽——▽ 1 min,
●——● 10 sec.

3.3. Auswirkung der Hitzebehandlung auf den RNS-DNS-Gehalt der Zellen des Stammes PHB⁻4

Parallel zum vorigen Versuch (3.2.) wurde die Wirkung der durch die Hitzebehandlung ausgelösten Veränderung an endogene Nukleasen auf die zelleigene RNS und DNS untersucht. Dabei wurden die gleichen Bedingungen der Hitzebehandlung wie beim Versuch 3.2. angewandt, jedoch wurde hier eine Zellsuspension mit 2 mg TG Zellen/ml verwendet. Die Hitzeschockbehandlung erfolgte bei 65°C für 10 sec, 1, 5 und 10 min; die Nachinkubation wurde bei 50°C in 0 bis 120 min durchgeführt. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden die Kleinproben je mit 10 ml Zellsuspension aus dem Inkubationsbad entfernt, gekühlt und bei 4000 Upm 20 min lang abzentrifugiert. Im niedergeschlagenen Sediment wurde die RNS- und DNS-Bestimmung nach deren Extraktion wie unter den bereits angegebenen Methoden durchgeführt.

Die erhaltenen Gehaltswerte für DNS und RNS in % vom TG der Zellen bei den Proben mit verschiedenen Hitzeschockbehandlungen wurden gegen die Zeitintervalle der Nachinkubation bzw. in Relation zu den RNS-, DNS-Gehaltswerten bei Zellen ohne Behandlung graphisch augetragen (Abbildung 20).

3.3.1. Auswirkung der Hitzebehandlung auf den RNS-Gehalt

Wie erwartet, wurde der RNS-Gehalt durch die Hitzebehandlung allgemein stark herabgesetzt (Abbildung 20). Die kombinierte Hitzebehandlung, bestehend aus Hitzeschock bei 65°C für 10 min mit anschließender zweistündiger Inkubation bei 50°C, erbrachte dabei den größten RNS-Verlust (90%). Der Verlauf der spezifischen Aktivität der RNase (Abbildung 16) und zum Teil auch der Phosphodiesterase (Abbildung 18) nahezu spiegelbildlich gleich.

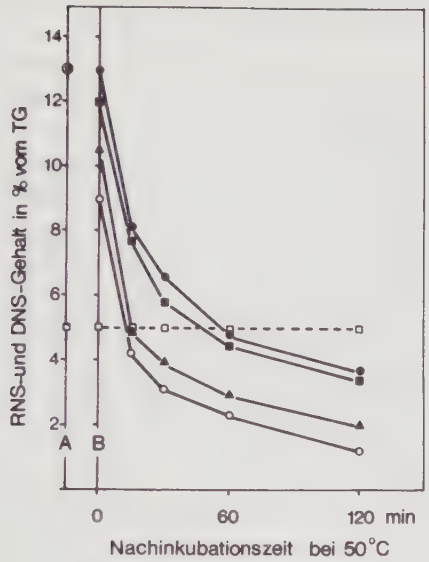


Abb. 20: Einfluß der Hitzebehandlung auf den RNS- und DNS-Gehalt. Autotroph gewachsene Zellen wurden einer Hitzebehandlung; Hitzeschock bei 65°C für 10 sec, 1, 5 und 10 min nachfolgend mit einer Nachinkubation für die Zeit 0, 15, 30, 60 und 120 min bei 50°C ausgesetzt. Der Gehalt an RNS und DNS in % vom Trockengewicht wurde sowohl in den nicht-hitzebehandelten Zellen (A) als auch in hitzebehandelten Zellen (B) (zur Zeit 0 bzw. bis 120 min Nachinkubation) bestimmt. Symbole: Veränderung des Gehaltes an RNS während der Nachinkubation bei 50°C bei den Proben mit einer Hitzeschockbehandlung bei 65°C für

●——● 10 sec,
■——■ 1 min,
▲——▲ 5 min,
○——○ 10 min,
□---□ DNS-Gehalt bei allen Proben (konstant geblieben).

3.3.2. Auswirkung der Hitzebehandlung auf den DNS-Gehalt

Eine Veränderung des DNS-Gehaltes konnte während der Hitzebehandlung nicht festgestellt werden, und zwar unter allen angewandten Bedingungen. Dies ist darauf zurückzuführen, daß das DNase-System durch die Hitzebehandlung (wie vorher nachgewiesen wurde; Abbildung 19) sehr stark beeinträchtigt wird. Dieses Ergebnis konnte durch einen ähnlichen Versuch gesichert werden, bei dem die Zellen einer erweiterten Hitzebehandlung durch eine Vorinkubation (für 1 Std. bei 37°C; Temperatur-Optima der DNase-Aktivität, vgl. Abbildung 9) ausgesetzt wurden. Durch diese erweiterte Hitzebehandlung konnte der DNS-Gehalt der Zellen auch kaum verändert werden.

4. Lokalisation der Nukleasen in Zellmaterial

Nachdem die vorausgehenden Versuche ergeben hatten, daß während der Hitzeschockbehandlung und der Nachinkubation die Bildung bzw. Freisetzung nur der RNase und in geringer Masse der Phosphodiesterase induziert wird und die DNase und die Alkalische Phosphatase unverändert bleiben, stellte sich die Frage nach der Lokalisation der RNase. Um diese Frage zu prüfen, wurden hitzebehandelte (10 min bei 65°C und nachfolgend 2 Std. bei 50°C) und unbehandelte Zellen aufgeschlossen, und durch Zentrifugation wurde die Fraktionierung anhand verschiedener Methoden (TISSIÈRES et al., 1959; HUXLEY und ZUBAY, 1960; KURLAND, 1966; STEVENS und MORRISON, 1968) in abgewandelter Form durchgeführt. Das Schema (Abbildung 21) faßt alle Schritte zusammen, die von ganzen Zellen zu den geprüften Fraktionen führen. In diesen Fraktionen wurden die Aktivitäten der oben genannten Enzyme gemessen. Außerdem wurden die Malat-Dehydrogenase und NADH-Oxydase in die Untersuchung einbezogen. Die beiden Enzyme galten als Indikatoren für streng lösliche (Malat-DH) und partikelgebundene (NADH-Oxydase) Enzyme. Schließlich wurde die Ribosomen-Fraktion (Sediment 3) elektronenmikroskopisch geprüft und bestätigt, daß dieses Sediment hauptsächlich aus Ribosomen besteht (Abbildung 22).

Die genannten Enzyme wurden in folgenden Fraktionen bestimmt:
Ü 1: besteht aus dem Rohextrakt nach zweimaliger Zentrifugation des Homogenats bei 15.000 g für 30 min; Ü 2: ist die lösliche Fraktion nach Zentrifugation bei 100.000 g für 60 min; Ü 3: ist nach dreistündiger Zentrifugation bei 120.000 g erhalten worden;
Sediment 2: enthält die Membran und Sediment 3 enthält die Ribosomen.

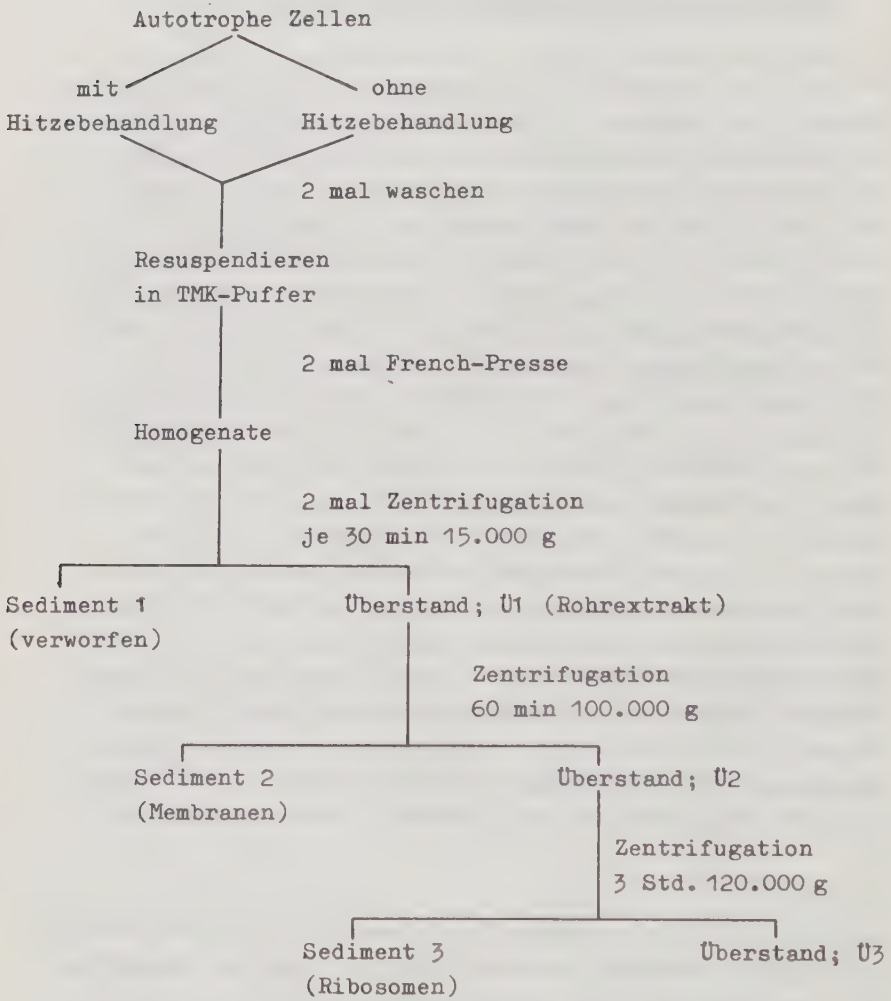


Abb. 21: Fraktionierung von Zellmaterial des Stammes PHB⁻4

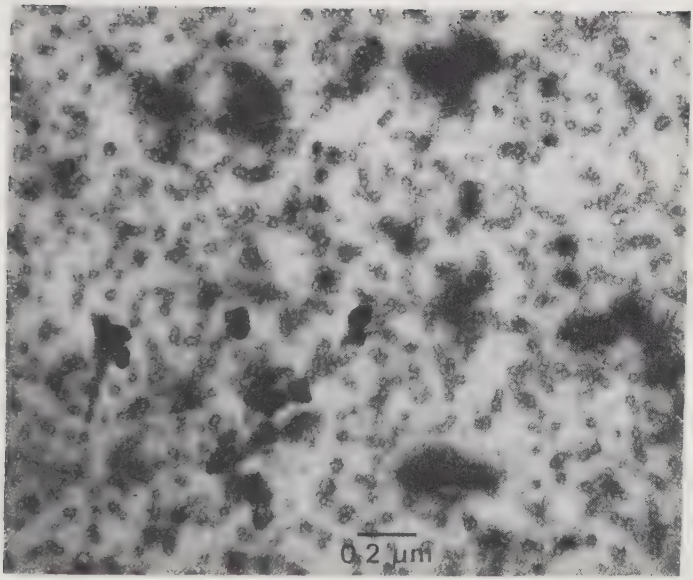


Abb. 22: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Ribosomen aus PHB$^-$4-Zellen. Gefriergetrocknete Zellen wurden mit der French-Presse aufgeschlossen. Die Ribosomen-Fraktion (Sediment 3) wurde durch hochtourige Zentrifugation (3 Std. bei 120.000 g) in Anwesenheit von Mg^{2+}-Ionen in der Suspensionslösung (TMK) gewonnen; Erläuterung im Abschnitt Methoden und in Abbildung 21. Die Ribosomen wurden für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit Uranylacetat (4%ig in H_2O, pH 5) negativ kontrastiert (VALENTINE et al., 1968).

Die Durchführung der enzymatischen Tests mit den verschiedenen Fraktionen wurde für die einzelnen oben genannten Enzyme wie bereits in Methoden angegeben durchgeführt.

4.1. Lokalisation der Aktivitäten der Indikatorenzyme

a. Malat-Dehydrogenase

In den löslichen Fraktionen (Überstand 1,2,3) war die Aktivität - sowohl die absolute als auch die spezifische - der Malat-Dehydrogenase am größten, in Partikel-Fraktionen (Sediment 2 und 3) dagegen lag nur eine sehr geringe Aktivität vor (Abbildung 23). Diese Beobachtung bedeutet, daß die Trennung durch Zentrifugation effektiv gewesen ist, daß aber das Sediment jeweils noch durch einen geringen Teil der löslichen Enzyme verunreinigt war. Die Aktivität der Malat-Dehydrogenase wurde durch die Hitzebehandlung sehr stark herabgesetzt. Das Enzym Malat-Dehydrogenase ist also sehr hitzelabil.

b. NADH-Oxydase

Die NADH-Oxydase ist ein membrangebundenes Enzym; die Verteilung ihrer Aktivität auf die verschiedenen Zellfraktionen spiegelt somit die Verteilung von Membran-Partikeln wider. Wie in Abbildung 24 dargestellt, enthielt das Sediment 2 (Membran-Fraktion) einen relativ hohen Anteil an Enzymaktivität, während das Sediment 3 (Ribosomen-Fraktion) nur sehr geringe Aktivität besaß. Die löslichen Fraktionen (Überstand 1, 2, 3) enthielten im allgemeinen höhere Enzymaktivität auch

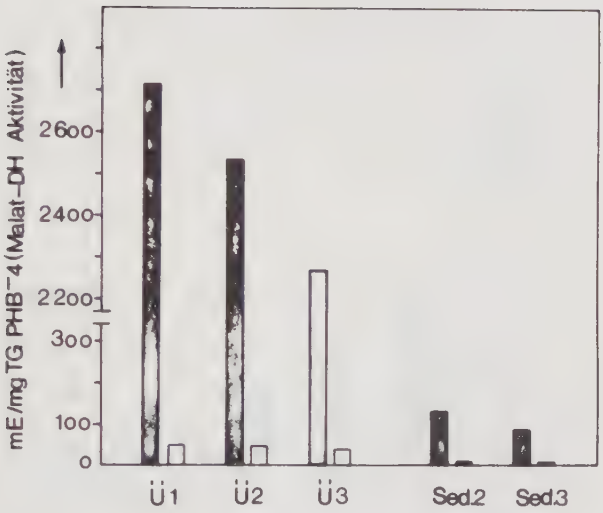


Abb. 23: Verteilung der Aktivität der Malat-Dehydrogenase. Die Verteilung der Aktivität (mE/mg TG) wurde sowohl bei Fraktionen der hitzebehandelten Zellen (10 min bei 65°C nachfolgend 2 Std. bei 50°C) als auch bei Fraktionen der nicht-hitzebehandelten Zellen bestimmt. Die Messung der Aktivität wurde, wie unter Methode 7.1. (a) angegeben worden ist, durchgeführt. Symbole: die dunkleren Kästen (■) geben die Aktivität bei Fraktionen der nicht-hitzebehandelten Zellen wider; die helleren (□) bei den Fraktionen der hitzebehandelten Zellen.

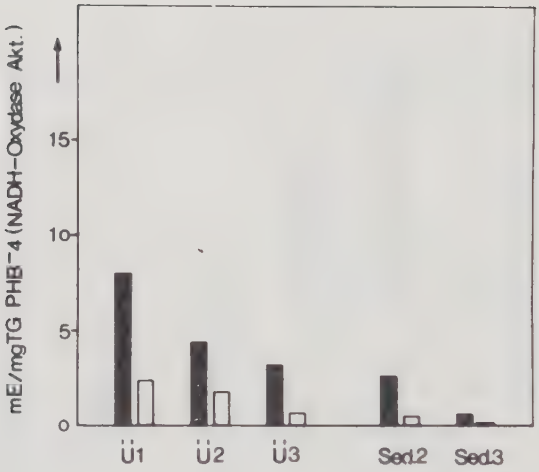


Abb. 24: Verteilung der Aktivität der NADH-Oxydase.
Die Aktivität der NADH-Oxydase (mE/mg TG) wurde bei den verschiedenen Fraktionen aus hitzebehandelten sowie aus nicht-hitzebehandelten Zellen bestimmt. Die Aktivitätsbestimmung folgte, wie es unter Methode 7.1. (b) beschrieben ist. Die dunklen Kästen (■) geben die Aktivität bei Fraktionen der Zellen ohne Hitzebehandlung wider, die helleren (□) aber bei Fraktionen der hitzebehandelten Zellen.

nach hochtouriger Zentrifugation. Das Zurückbleiben von NADH-Oxydase-Aktivität im Überstehenden läßt sich darauf zurückführen, daß durch Behandlung der Zellen mit der French-Presse die Zellmembran möglicherweise in sehr kleine Stücke zerfällt, die sich durch hochtourige Zentrifugation nicht sedimentieren lassen. Auch hier wurde die Aktivität der NADH-Oxydase in allen Fraktionen von hitzebehandelten Zellen als sehr stark erniedrigt befunden. Das deutet darauf hin, daß das Enzymsystem der NADH-Oxydase der Hitze gegenüber empfindlich ist.

4.2. Lokalisation der Aktivität der Nukleasen

Aufgrund der Lokalisation der Indikatorenzyme bzw. anhand elektronenmokroskopischen Aufnahmen beim Sediment 3 ließ sich zeigen, daß die Partikel-Fraktion weitgehend in eine Membran- und in eine Ribosomen-Fraktion aufgetrennt worden war. In den verschiedenen Zellfraktionen (lösliche, Membranen und Ribosomen) von Zellen mit bzw. ohne Hitzebehandlung wurde die Lokalisation der Aktivität der einzelnen Nukleasen ermittelt.

4.2.1. Lokalisation der RNase-Aktivität

Oben wurde schon hervorgehoben, daß die Hitzebehandlung der PHB$^-$4-Zellen eine Bildung oder Freisetzung von RNase hervorruft, wobei $>90\%$ der zelleigenen RNS abgebaut wurde. Die Messung der RNase-Aktivität (E/mg Protein) in verschiedenen Fraktionen sollte dazu beitragen, die Lokalisation der Enzymaktivität zu ergründen. Dabei ergaben sich folgende Resultate: Wie in Abbildung 25 dargestellt, enthielten die löslichen Fraktionen im allgemeinen die höchste RNase-Aktivität, die Partikel-Fraktionen hingegen nur einen geringen Anteil. In den löslichen Fraktionen der hitzebehandelten Zellen war die

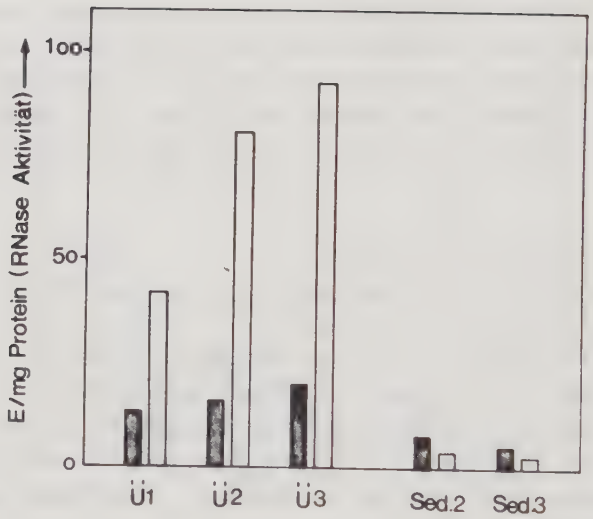


Abb. 25: Lokalisation der RNase-Aktivität.
Die Lokalisation der Aktivität der RNase (E/mg Protein) wurde sowohl bei Fraktionen der hitzebehandelten als auch der nicht-hitzebehandelten Zellen gemessen. Die Aktivitätsbestimmung der RNase wurde, wie unter Methode 7.2.1. angegeben, durchgeführt. Die helleren Symbole (□) geben die Aktivität der RNase bei Fraktionen der hitzebehandelten Zellen wider, die dunklen (■) jedoch die Aktivität bei Fraktionen der nicht-hitzebehandelten Zellen.

Aktivität (E/mg Protein) relativ viel höher als die in der gleichen Fraktion von Zellen ohne Behandlung; Partikel-Fraktionen zeigten hingegen ein umgekehrtes Bild. Das könnte bedeuten, daß die RNase durch die Zerstörung der ursprünglichen Zellordnung z.B. durch eine physikalische Behandlung (Hitzebehandlung) oder eine mechanische Behandlung (Zellaufschluß mit French-Presse) sich von den bestimmten Zellpartikeln wie Ribosomen- und auch Membranstrukturen ablöst und zum größten Teil in die lösliche Fraktion übergeht.

Dieses Ergebnis konnte durch einen weiteren Versuch gesichert werden. Dabei wurden die Ribosomen von Zellen ohne Hitzebehandlung verschiedenen Behandlungen ausgesetzt, und es wurde die RNase-Aktivität gemessen. Zuerst wurden mehrere Testansätze, die als Substrat 2%ige RNS aus Hefe enthielten, 0 bis 60 min lang bei 50°C inkubiert; die RNase-Aktivität blieb etwa gleich, wie an der mit der Inkubationszeit linear gebildeten Menge des UV-absorbierenden Materials ablesbar ist (Tabelle 1). Die gleichen Testansätze jedoch in diesem Fall ohne Zusatz von reiner Hefen-RNS ergaben nach einer Behandlung (Hitzeschock bei 65°C für 10 min gefolgt mit einer Inkubation für eine Stunde bei 50°C) fast die gleiche Menge an UV-absorbierenden Materials, die bereits nach einstündiger Inkubation bei 50°C mit reinem RNS-Substrat ermittelt wurde (E_{260} = 0.410). Dabei handelt es sich um eine RNase-Aktivität, die nur als Folge von der Einwirkung der RNase auf eigene Ribosomen-RNS zu betrachten ist. Wird dieser Ansatz mit Hefe-RNS versetzt und inkubiert, so entfaltet das Enzym noch seine hydrolytische Wirkung (Zunahme der E_{260} auf 0.590 innerhalb von 30 min und E_{260} = 0.850 innerhalb von 60 min Inkubation).

Tab. 1: RNase-Aktivität in der Ribosomen-Fraktion aus frisch geernteten, nicht hitzebehandelten PHB⁻4-Zellen

Behandlung der Ribosomen	Nr.	E.S.-Inkubation min	Ext. 260 nm je Testansatz (2 ml)	Bemerkungen
1. Inkubation bei 50°C mit reiner Hefen-RNS	1	0	0	
	2	5	0,35	
	3	10	0,90	
	4	30	0,180	
	5	60	0,460	
2. Hitzebehandlung: Hitzeschock 10 min bei 65°C, danach 1 Std. Inkubation bei 50°C	1	0	0,410	Probe 2 und 3 inkubiert mit reiner Hefen-RNS bei 50°C.
	2	30	0,590	
	3	60	0,850	

4.2.2. Lokalisation der DNase-Aktivität

Die Verteilung der DNase-Aktivität auf die verschiedenen Zellfraktionen war mit der RNase-Aktivität fast identisch. Die löslichen Fraktionen entwickelten den größten Anteil an DNase-Aktivität, die Partikel-Fraktionen (Ribosomen und Membranen) dagegen nur einen geringen Anteil (Abbildung 26). Während die spezifische RNase-Aktivität in hitzebehandelten Zellen hoch war, war die DNase-Aktivität während der Hitzebehandlung (vgl. Abbildung 19) stark zurückgegangen.

Die Partikelfraktionen insebsondere aus nicht-hitzebehandelten Zellen verfügten über eine relativ hohe spezifische DNase-Aktivität. Sie war jedoch geringer als die spezifische Aktivität der löslichen Fraktionen. Bei den hitzebehandelten Zellen war die Partikel-gebundene DNase-Aktivität stark zurückgegangen. Dieser Befund steht mit der Vorstellung im Einklang, daß die DNase normalerweise Partikel-gebunden ist und durch Zerstörung der ursprünglichen Zellstruktur während des Zellaufschlusses in die lösliche Fraktion übergegangen ist.

4.2.3. Lokalisation der Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Wie in Abbildung 27 dargestellt, ist die Alkalische Phosphatase auf alle Fraktionen verteilt. Die höchste Aktivität wurde bei den Partikel-Fraktionen, insbesondere bei den Membran-Partikeln, festgestellt. Durch die Hitzebehandlung wurde die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wie bereits vorher erörtert (3.2.2.) sehr stark beeinträchtigt.

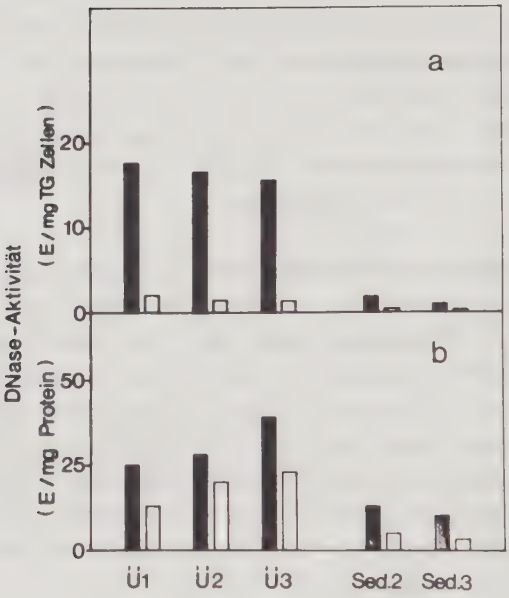


Abb. 26: Lokalisation der DNase-Aktivität.
Die Verteilung der DNase-Aktivität, sowohl die absolute (a) als auch die spezifische (b), wurde bei Fraktionen der hitzebehandelten Zellen (hellere Kästen □) bzw. bei Fraktionen der nicht-hitzebehandelten Zellen (dunklere Kästen ■) bestimmt. Die Aktivitätsbestimmung wurde wie unter Methode 7.2.2. angegeben ausgeführt.

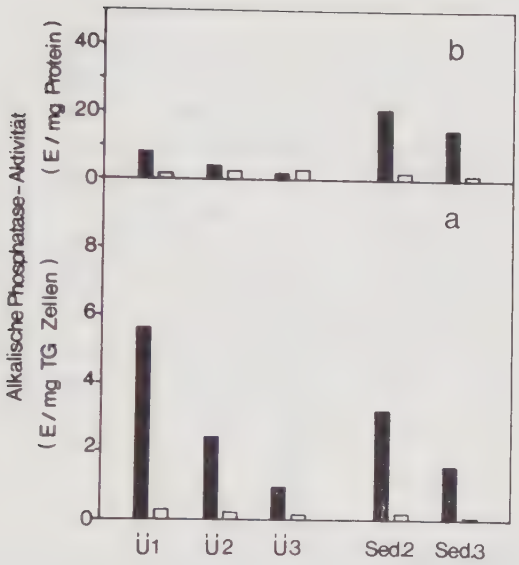


Abb. 27: Lokalisation der Aktivität der Alkalischen Phosphatase.
Die Lokalisation der Alkalischen Phosphatase, sowohl die absolute (a) als auch die spezifische (b), wurde bei den verschiedenen Fraktionen aus nicht-hitzebehandelten Zellen (dunkle Kästen ■) bzw. hitzebehandelten Zellen (hellere Kästen □) bestimmt. Die Aktivitätsmessung der Alkalischen Phosphatase wurde wie unter Methode 7.2.3. beschrieben durchgeführt.

4.2.4. Lokalisation der Aktivität der Phosphodiesterase

Bei der Phosphodiesterase war die Verteilung der Aktivität (E/mg Protein) auf die verschiedenen Fraktionen unterschiedlich. Im allgemeinen besaßen die löslichen Fraktionen den größten Anteil an Enzymaktivität, während die Partikel-Fraktionen einen relativ geringen Anteil enthielten (Abbildung 28). Auch hier (wie bei der RNase) war die spezifische Aktivität der Phosphodiesterase in den löslichen Fraktionen von hitzebehandelten Zellen relativ höher als die in derselben von unbehandelten Zellen. Das bedeutet, daß beide Enzyme (RNase und Phosphodiesterase) entweder durch die Hitzebehandlung aktiviert wurden, oder zumindest gegen die Hitze stabil waren, während DNase und Alkalische Phosphatase durch Hitze geschädigt oder inaktiviert wurden.

5. Charakterisierung der Nukleinsäureabbauprodukte aus hitzebehandelten PHB⁻4-Zellen durch Dünnschicht-Chromatographie

Die vorausgehenden Untersuchungen haben ergeben, daß durch die Hitzebehandlung UV-absorbierendes Material ausgeschieden wird, und daß weiterhin zelleigene Ribonukleasen wirksam werden. Es war anzunehmen, daß es sich bei dem UV-absorbierenden Material um Abbauprodukte der RNS handelt. Es stellte sich die Aufgabe, diese RNS-Abbauprodukte im Suspensionsmedium nachzuweisen und zu identifizieren. Um die Abbauprodukte abzutrennen, wurde die der Hitzeschockbehandlung und der Nachinkubation unterworfene Suspension zentrifugiert (30 min bei 5000 Upm); das Überstehende wurde sofort oder nach Lyophilisieren durch Entsalzen (Methode 10) gereinigt. Die Trennung und Identifizierung der so erhaltenen RNS-Abbauprodukte wurde nach der beschriebenen Methode 11 durchgeführt.

Die Tabelle 2 gibt die erhaltenen R_f-Werte wider, wie sie durch visuelle Auswertung im UV-Licht (245 nm) oder durch

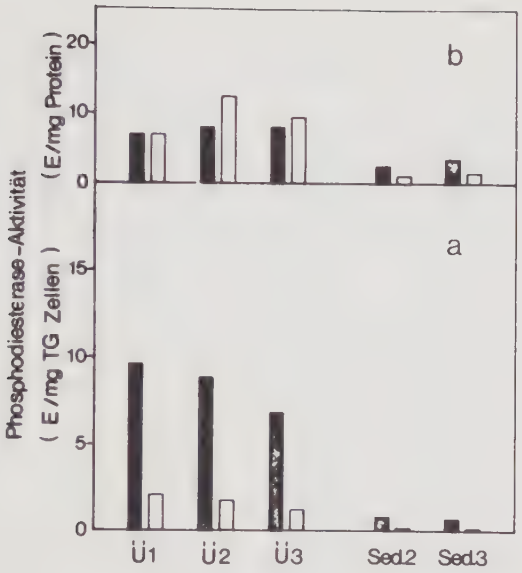


Abb. 28: Lokalisation der Aktivität der Phosphodiesterase. Die Lokalisation der Phosphodiesterase-Aktivität, sowohl die absolute (a) als auch die spezifische (b), wurde bei Fraktionen der hitzebehandelten Zellen (dunkle Kästen ■) sowie bei Fraktionen der nicht-hitzebehandelten Zellen (hellere Kästen □) ermittelt. Die Messung der Aktivität wurde wie unter Methode 7.2.4. angegeben ausgeführt.

Tab. 2: Zusammenstellung der R_f-Werte[1] für reine RNS-Derivate und die RNS-Abbauprodukte aus hitzebehandelten PHB⁻4-Zellen

Nr.	RNS-Derivate	R_f-Werte[2]		RNS-Abbauprodukte (aus PHB⁻4-Zellen)	
		Auswertung visuell	Auswertung mit Densitometer	Vergleichbare R_f-Werte	Intensität[3] der aufgetrennten RNS-Abbauprodukte
1	GTP	0,9	0,91	0,91	±
2	ATP	1,7	1,8	1,7	±
3	CTP	3,9	3,6	4,1	±
4	UTP	5,6	5,0	5,5	±
5	GDP	6,0	6,1	6,7	±
6	ADP	8,0	8,0	8,5	-
7	CDP	14,7	14,0	15,5	+
8	UDP	21	21	19,5	+
9	Guanin	24,1	24,2	25,8	±
10	GMP	25,5	26,3	26	±
11	Adenin	28,5	30	28,5	-
12	AMP	34,7	34,3	34,5	+
13	Adenosin	43	42,2	43	+
14	Guanosin	49,4	49	48	-
15	CMP	53	52,4	52	+
16	UMP	65	66	63,6-65	-
17	Cytosin	66,7	66,7	66	-
18	Uracil	70	69,2	71,3	-
19	Cytidin	70,6	76	77	+
20	Uridin	82,4	82,2	82	+
21	Ribose	>98	>98	>98	± starke Polarität

1) Trennung auf PEI-Cellulose-Fertigplatten, G, fluoresziert, Schicht; 0,5 mm, Fließmittel; 1 M NaCl.

2) R_f-Werte für reine RNS-Derivate im gleichen Trennsystem.

3) Intensität der getrennten RNS-Abbauprodukte im UV-Bereich beim Densitometer-Diagramm.
+ = vollständige Trennung, ± = schwache Trennung,
- = keine deutliche Trennung.

Densitometer-Diagramme ermittelt wurden; die Angaben beziehen sich sowohl auf reine RNS-Derivate als auch auf RNS-Abbauprodukte aus PHB$^-$4-Zellen.

Der Vergleich der getrennten Hydrolysate mit den Testchromatogrammen erlaubte die Identifizierung des größten Teils der erhaltenen RNS-Abbauprodukte; neben den R_f-Werten wurden die spezifischen Absorptions-Intensitäten der einzelnen Komponenten im entsprechenden UV-Bereich der Densitometer-Diagramme ausgewertet. Wie im Chromatogramm (Abbildung 29) dargestellt, waren im Gemisch der RNS-Abbauprodukte fast alle RNS-Derivate vertreten. Besonders hervorzuheben sind die Komponenten Adenosin, AMP, ATP, Guanin, GDP, Cytidin, CMP, CDP, CTP, Uridin, UDP, UTP und Ribose; weitere Komponenten sind nur in geringer Menge vorhanden und hier nicht deutlich getrennt worden.
Ein ähnliches Trennungsbild hatte das Gemisch derjenigen RNS-Abbauprodukte, welche im Laufe der Einwirkung eines zellfreien Extraktes aus vollinduzierten PHB$^-$4-Zellen auf ein reines RNS-Präparat aus Hefe (Inkubation bei 37°C für 2 Std.) freigesetzt worden waren.

Aus diesen Ergebnissen war der Schluß zu ziehen, daß bei vollinduzierten PHB$^-$4-Zellen die endogene RNase und auch Phosphodiesterase für diesen fast vollständigen Abbau sowohl der zelleigenen RNS als auch der zugesetzten Hefe-RNS verantwortlich sind. Für beide Enzyme konnte in einem Vorversuch festgestellt werden, daß sie hitzestabil sind.

In welchem Ausmaß jedes der beteiligten Enzymsysteme an diesem Abbauvorgang beteiligt sein kann, ließ sich hier nicht ermitteln, da eine quantitative Trennung der freigesetzten RNS-Abbauprodukte im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen wurde.

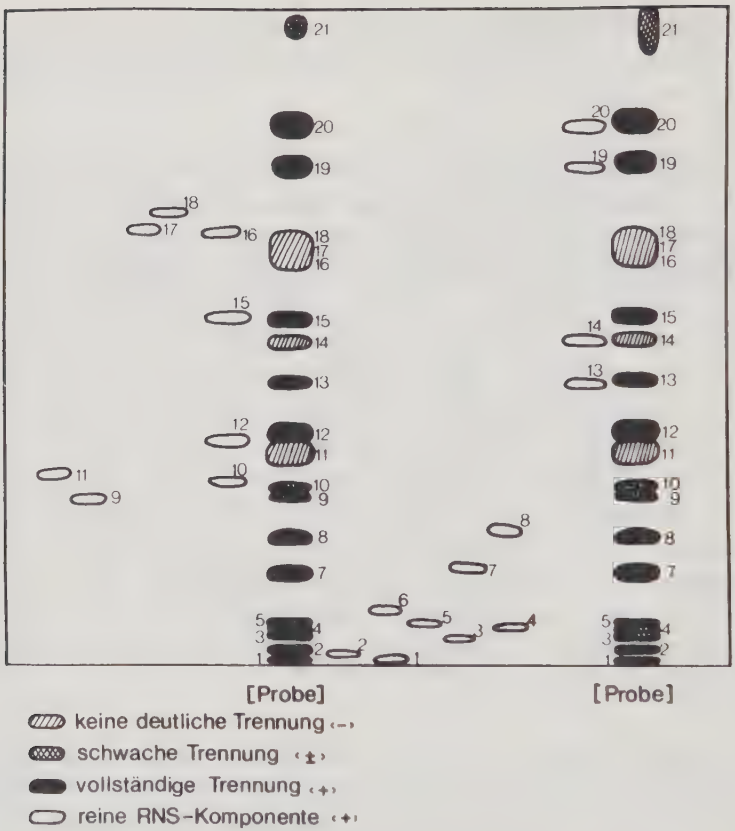


Abb. 29: Identifizierung der RNS-Abbauprodukte aus hitzebehandelten Zellen. Die Trennung der während der Hitzebehandlung freigesetzten RNS-Abbauprodukte (Probe) erfolgte durch Dünnschicht-Chromatographie. Die Erkennung bzw. Identifizierung der getrennten Komponenten wurde durch Vergleich mit Standardsubstanzen unter UV-Licht (E. 245 nm) vorgenommen. Die in der Abbildung angegebenen Ziffern (1 bis 21) geben, wie in Tabelle 2 dargestellt ist, die betreffende RNS-Komponente - sowohl reine als auch aus Bakterien-RNS stammende Komponente - wider.

IV. DISKUSSION

Unter den möglicherweise zur Schließung der Eiweißlücke in der Welternährungslage heranzuziehenden Mikroorganismen nehmen die Knallgasbakterien eine besondere Stellung ein: Sie lassen sich in einer rein mineralischen Nährlösung heranziehen und mit H_2 als Energie- und CO_2 als Kohlenstoffquelle ernähren. Die Substrate stehen in sehr reiner Form zur Verfügung, so daß eine Einschleusung von Karzinogenen oder anderen toxischen Stoffen mit diesen Bakterien in die Nahrungskette nicht befürchtet zu werden braucht. Der Prozeß der CO_2-Fixierung gleicht dem der höheren Pflanzen. Die Energie-, Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sind relativ billig. Außerdem lassen sich die Wasserstoffbakterien auch heterotroph ernähren, so daß sie auch für die Verwertung organischer Abfallstoffe brauchbar sind. Die Bakterien sind den herkömmlichen Futter- und Nahrungsmitteln in mehrfacher Hinsicht überlegen. Ihre Wachstumsrate ist sehr hoch; daraus ergibt sich eine ökonomische Nutzung der notwendigen Produktionsmittel. Außerdem ist der Gehalt der Zellen an Proteinen sehr hoch und kann bis zu 60 oder 70% Protein vom Trockengewicht betragen.

Die Geschwindigkeit des Wachstums wird augenfällig, wenn man die Verdopplungszeit der Bakterien mit der von höheren Organismen vergleicht. Während sich die Hydrogenomonas-Stämme autotroph in 140 bis 150 Minuten und heterotroph in 90 Minuten und auch Hefen und Algen sich innerhalb von 1 - 6 Stunden verdoppeln (OGUR, 1966; HAMER, 1969; KIHLBERG, 1972), beträgt die Verdopplungszeit des Geburtsgewichts beim Kaninchen 6, beim Schwein 14 und beim Rind 47 Tage (LANG und RANKE, 1950; NEHRING, 1972).

Aber auch unter dem Gesichtspunkt der Ernährungsphysiologie sind die Einzellerproteine von Vorteil. Sie sollten den Menschen aus dem Dilemma der doppelten Proteinlücke (Mangel an ausreichenden Mengen, unzureichende nutritive Wertigkeit)

herausführen. Die Einzellerproteine und auch das Eiweiß von H. eutropha sind bezüglich ihrer biologischen Wertigkeit und ihres Gehaltes an essentiellen Aminosäuren mit dem Casein der Milch vergleichbar (FOSTER und LITCHFIELD, 1964; CALLOWAY und KUMAR, 1968; LITCHFIELD, 1972).

Die hohe Wachstumsrate der Mikroorganismen steht mit der hohen Effizienz der Proteinbildung und mit dem Gehalt an Ribosomen sowie an RNS in unmittelbarem Zusammenhang. Der Gehalt an RNS ist eine Funktion der Wachstumsrate (JERUSALIMSKY et al., 1962; MAALØE und KJELDGAARD, 1966; FENCL, 1966). Der Gehalt an Nukleinsäuren läßt sich während des Wachstums nicht herabsetzen ohne gleichzeitig die Wachstumsrate zu vermindern. Die Bakterien verfügen also verglichen mit den konventionellen Nahrungsmitteln über einen außerordentlich hohen Gehalt an Nukleinsäuren, insbesondere an RNS. Beispielsweise beträgt der Nukleinsäuregehalt bei Hydrogenomonas H16 Wildtyp und Mutante PHB^{-}4 16 bis 20% vom Trockengewicht; das sind 13 - 16% in Form von RNS. Überschlägig kann man 20 g RNS je 100 g Bakterienprotein annehmen. Demgegenüber enthalten Leber und Rohfisch 4 und 5,7 g Nukleinsäure je 100 g Protein (MILLER, 1968), Weizen und Roggen enthalten 1,1 bzw. 4 g Nukleinsäure je 100 g Protein (LANG und SCHAEFFNER, 1963).

Von der Ernährungsphysiologie der Menschen und anderer Tierarten ist es bekannt, daß der Mensch und einige seiner Nutztiere (wie Schweinen) nicht in der Lage sind, die Nukleinsäuren - insbesondere die purinhaltige - vollständig abzubauen bzw. die NS-Abbauprodukte in Form von Harnsäuren auszuscheiden. Die Belastbarkeit des Menschen mit EZP-Produkten von einem so hohen Gehalt an RNS in der Nahrung ist daher nur begrenzt. Nach Ansicht der Autoren WASLIEN et al.,(1966), BUNKER (1969), EDOZIEN et al. (1970), der "FAO-Protein Advisory Group" (1970) ist eine tägliche Aufnahme von 2 g Nukleinsäure für einen gesunden Menschen gerade noch vertretbar, während 3 g Nukleinsäure-Tagesration bereits ein erhebliches Risiko (Gichtbildung u.ä.) bedeuten. Aufgrund dieser Erkenntnis konn-

ten nur zwischen 15 und 20 g EZP-Produkt aus Bakterien des Stammes PHB⁻4 (mit 16 - 20%) täglich zur Kost eines gesunden Menschen zugegeben werden, um innerhalb der Verträglichkeitsgrenzen zu bleiben.

Herabsetzung des hohen Nukleinsäure-Gehaltes im EZP-Produkt aus Hydrogenomonas-Zellen

Wie schon vorher erörtert, besteht zwischen der Proteinsynthese und des hohen RNS-Gehaltes in den Bakterienzellen eine enge Relation. Eine Erniedrigung des RNS-Gehaltes durch genetische Veränderung des Zellstoffwechsels ist dabei nicht möglich, ohne gleichzeitig die Wachstumsrate bzw. die Proteinsynthese zu beeinträchtigen. Durch die Veränderung der Milieufaktoren, wie die Anzucht der Zellen unter Mengel an einer für das normale Wachstum notwendigen Verbindung (Stickstoff-, Magnesium-, Phosphat- und Schwefelquelle; siehe Abbildung 2) wurde auch keine wesentliche Erniedrigung an RNS-Gehalt erbracht.

Es wäre denkbar, bestimmte Verfahren zur Erniedrigung oder Herabsetzung des hohen Nukleinsäuregehaltes zu überprüfen und dabei eine Methode zu entwickeln. Wie bereits im experimentellen Teil erörtert wurde, bot die Hitzebehandlung eine Möglichkeit; vor allem den hohen RNS-Gehalt im EZP-Produkt aus den untersuchten Hydrogenomonas-Stämmen sehr stark herabzusetzen. Die optimalen Bedingungen der Hitzebehandlung waren: 10 min Hitzeschockbehandlung bei 65°C nachfolgend mit einer zweistündigen Nachinkubation bei 50 - 55°C, wobei mehr als 90% des RNS-Gehaltes aus den Zellen entfernt werden konnte (RNS-Gehalt von 13% auf weniger als 1,5% vom TG erniedrigt). Durch diese Behandlung wurde keine nennenswerte Veränderung an Protein- bzw. DNS-Gehalt festgestellt.

Die oben genannte Hitzebehandlung unterscheidet sich von der bei Hefezellen angewandten Methode nach MAUL et al. (1970);

OHTA et al. (1971); IMADA et al. (1972a) insofern, als sich die optimale Hitzeschockbehandlung bei den Bakterien für etwas längere Zeitdauer (10 min) bei 65°C durchführen ließ, während bei diesen Autoren eine Hitzeschockbehandlung nur für kurze Zeitdauer (3 - 17 sec.) bei einer etwas höheren Temperatur (68°C) angewandt worden war.

Die Hitzeschockbehandlungen bei Hydrogenomonas-Bakterien für kürzere Zeitdauer (10 sec, 1 und 5 min) waren im Vergleich zu der Hitzeschockbehandlung für 10 min auch bei Temperaturen über 65°C weniger effektiv (Abbildungen 3 und 20). Bezüglich der Nachinkubationsbedingungen (Zeit und Temperatur der Nachinkubation) waren die als optimal ermittelten Bedingungen für den weiteren Abbau der Hydrogenomonas-RNS (2 Std. bei 50 - 55° C) weitgehend identisch mit den Bedingungen für die Hydrolyse von Hefe-RNS (OHTA et al., 1971; IMADA et al., 1972a, 1972b). Allerdings war die Geschwindigkeit des RNS-Zerfalles in Hydrogenomonas-Zellen während der ersten Inkubationsstunde verhältnismäßig viel höher als die in der nachfolgenden Inkubationszeit bei der gleichen Temperatur.

Veränderung der Aktivität der Nukleasen während der Hitzebehandlung (Mechanismus des RNS-Zerfalls)

Nachdem MAUL et al. (1970) durch die Hitzebehandlung den hohen RNS-Zerfall bei den Hefezellen erzielen konnten, stellte sich die Frage, welche Mechanismen an diesem Abbauvorgang beteiligt sind. Zuerst wurde vermutet, daß die Hitzeschockbehandlung bei 68°C für kürzere Zeitdauer (3 - 17 sec) primär die Aktivierung der endogenen Nukleasen auslöst und daß im Laufe der nachfolgenden Inkubation (2 Std. bei 50 - 55°C) die Hydrolyse der zelleigenen RNS durch die aktivierten RNasen erfolgt (OHTA et al., 1971; IMADA et al., 1972a). Aufgrund enzymatischer Untersuchungen mit Hefe-RNasen konnten IMADA et al. (1972b) jedoch feststellen, daß die durch die Hitzebehandlung

bewirkte Aktivierung der für den RNS-Zerfall verantwortlichen RNase bei Candida lipolytica auf die Aufhebung der hemmenden Einwirkung von ATP und einem proteinartigen Inhibitor zurückzuführen ist. Beide Einflüsse werden durch Hitze ausgeschaltet; die ATP-Regeneration wird unterbunden und der proteinartige Inhibitor wird durch ein 15minütiges Erhitzen bei 37°C denaturiert. Der hemmende Effekt der beiden Komponenten ist synergistisch, d.h. die Hemmung der RNase-Aktivität durch eine Kombination der beiden Stoffe ist viel effektiver als durch die einzelnen Komponenten. Ihre hemmende Einwirkung ist spezifisch, sie hemmten nur die zelleigene RNase und zeigten keinen Hemmeffekt gegen RNasen aus verschiedenen anderen Quellen.

Die genannten Autoren konnten weiter feststellen, daß die meisten Purinnukleotide wie ATP und GTP bei einer Konzentration von 2×10^{-4} M, ADP, GDP, AMP, GMP bei 2×10^{-4} bis 2×10^{-3} M sehr stark hemmend auf die RNase-Aktivität wirkten. Die Pyrimidinbasen und -nukleotide zeigten hingegen nur einen schwachen Hemmeffekt.

Daß ATP und andere Purinnukleotide eine hemmende Wirkung auf die RNase-Aktivität entfalten, ist bereits von mehreren Autoren für andere RNasen aus verschiedenen Organismen festgestellt worden. GAMBLE und WRIGHT (1965) fanden, daß die Aktivität der pankreatischen RNase durch relativ hohe Konzentration von ATP, ADP,und GDP stark gehemmt wird. Untersuchungen von IRIE (1969a und 1969b) haben ergeben, daß die Aktivität der RNase (M) aus Aspergillus saitoi durch Ribonukleoside und Ribonukleotide kompetitiv gehemmt wird, wobei 2'-AMP, 3' AMP und 5'-AMP den höchsten Hemmeffekt erbrachten. YAMASAKI und ARIMA (1967, 1969, 1970) und YAMASAKI et al. (1970) konnten feststellen, daß etwa 90 bis 100% der Aktivität auch der intracellulären RNase aus Bacillus subtilis durch geringe ATP- und ADP-Konzentration (10^{-3} bis 10^{-7} M) gehemmt wird. Diese Autoren nahmen an, daß ATP als spezifischer Regulator oder Inhibitor der intracellulären RNase fungiert, um die zelleigene RNS gegen die

Hydrolyse durch die RNase unter normalen Wachstumsbedingungen zu schützen. 1971 fanden VENKOV et al., daß auch die Aktivität der RNase II aus E.coli durch geringe ATP-Konzentration (10^{-3} bis 5 x 10^{-3} M) gehemmt wird. Ob ähnliche Hemmfaktoren wie die oben erwähnten auch hier bei den untersuchten Hydrogenomonas-Stämmen für die Hemmung der RNase-Aktivität im normalen Zustand der Zelle verantwortlich sind, ist noch zu prüfen. Da die Aktivität der RNasen auch hier bei unseren Stämmen erst durch die Hitzeschockbehandlung bei 65°C für 10 min ausgelöst wird, und da die meisten oben genannten Hemmstoffe (ATP, GDP, ADP, AMP und andere Nukleotide und Nukleoside) als Intermedärprodukte für die RNS-Synthese schon in der Zelle vorhanden sind, ist anzunehmen, daß auch hier ähnliche Faktoren für die Hemmung der RNase-Aktivität und damit die Erhaltung der zelleigenen RNS im normalen Zustand der Zelle verantwortlich waren.

Einige Eigenschaften der vollinduzierten Nukleasen (vor allem der RNase) aus Hydrogenomonas-Bakterien

Nach EGAMI und NAKAMURA (1969) ist eine Definition der RNasen, abgesehen von deren einzelnen Eigenschaften und Charakteristika (wie Struktur, Zusammensetzung, Molekulargewicht, Empfindlichkeit gegenüber Temperatur, pH-Wert, Salze und andere Milieufaktoren) nur hinsichtlich ihrer hydrolytischen Funktion bzw. Substrat-Spezifität vorgenommen worden. Diese Autoren bezeichneten die RNasen im allgemeinen als Phosphodiesterasen, die spezifisch RNS hydrolysieren, jedoch nicht in der Lage sind, DNS und einfache Phosphodiester-Komponenten wie bis-p-Nitrophenylphosphat zu hydrolysieren. RNasen verschiedener Herkunft besitzen im allgemeinen ein kleines Molekulargewicht (für unspezifische RNasen zwischen 30.000 und 40.000; für basen-spezifische nur 11.000 bis 13.000); sie sind relativ hitzestabil und haben einen breiten pH-Bereich (zwischen pH 4 und 9). Aufgrund dieser Eigenschaften (Hitzestabilität, kleines Molekulargewicht usw.) sind die RNasen einfach von anderen Proteinen abzutrennen und lassen sich für biochemische Un-

tersuchungen ohne Komplikationen einsetzen. Daß sich im Zellmaterial oder im Suspensionsmedium vieler Organismen Ribonukleasen-Aktivität nachweisen läßt, ist mehrfach beschrieben worden (ELSON, 1958, 1959; BOLTON et al., 1959; SPAHR und HOLLINGOWRTH, 1961; SPAHR und SCHLESSINGER, 1963; TAL und ELSON, 1963; WADE und LOVETT, 1961; WADE und ROBINSON, 1966; SPAHR, 1964; NEU und HEPPEL, 1964a, 1965; TAKAI et al., 1966, 1967; HEPPEL, 1967; CHAKRABARTTY et al., 1968; LOGAN und SINGER, 1968; ROBERTSON et al., 1968; RAY und BURMA, 1970 u.a.). EGAMI und NAKAMURA (1969) stellten die Eigenschaften und Wirkungen vieler Ribonukleasen aus zahlreichen Organismen (Bakterien, Protozoen, Streptomyceten, Hefen und Algen) in einer zusammenfassenden Übersicht dar.

Den Ergebnissen der enzymatischen Versuche der vorliegenden Arbeit läßt sich entnehmen, daß während der Hitzebehandlung der Hydrogenomonas-Zellen nur die Aktivierung bzw. Freisetzung der RNase und in geringerem Umfang der Phosphodiesterase begünstigt wird, während die Alkalische Phosphatase und die DNase dadurch stark beeinträchtigt wurden. Dieser Befund beantwortet auch die Frage, warum sich der Nukleinsäureabbau auf die RNS beschränkt hatte, während der DNS-Gehalt der Zellen unverändert blieb. Ausgehend von diesen Befunden werden die hier ermittelten Eigenschaften der RNase und zum Teil auch der Phosphodiesterase eingehend mit anderen Ribonukleasen aus verschiedenen Quellen zum Vergleich einbezogen. Wegen der Mannigfaltigkeit dieser RNase-Systeme, auch bei demselben Organismus, werden an dieser Stelle die Eigenschaften der eigenen RNasen nur mit den Eigenschaften einiger RNase-Systeme aus bestimmten Organismen verglichen. Um diesen Vergleich übersichtlich zu machen, werden die ermittelten Eigenschaften für die RNasen aus Hydrogenomonas H16 (Wildtyp)- und PHB$^-$4-Zellen und die der anderen RNase-Systeme aus Escherichia coli, Hefe, Algen und die pankreatische RNase in der nachfolgenden Tabelle 3 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 3: Vergleich der Eigenschaften der RNasen aus Hydrogenomonas-Bakterien mit anderen RNase-Systemen aus anderen Mikroorganismen

Organismus (RNase-Quelle)	RNase-System	pH-Optima
Bakterien		
Hydrogenomonas eutropha		
H16 Wildtyp	RNase	7.4 - 7.6
PHB$^-$4	RNase	7.4 - 7.6
Escherichia coli	RNase I[1,2]	8.1
	RNase II[3] (Phosphodiesterase)	7 - 8
	RNase III[4]	7.6 - 9.75
Hefe		
Saccharomyces cervisiae	RNase[5]	7.3
S. fragilis x S.dobzhanskii	RNase I[6,7]	7.4
	RNase II[6,7]	7.6
Algen		
Aspergillus oryzae (Takadiastase)	RNase T_1[8,9,10]	7.5
	RNase T_2[11,12]	4.5
Pankreatische-RNase	RNase I[13,14,15]	7.7

Symbole:

+ = Aktivität positiv beeinflußt (Aktivierung)
± = Aktivität kaum positiv beeinflußt
- = Hemmung der Aktivität

Hitzestabilität	Temperatur-Optimum	Effektoren						
		Mg^{2+}	Ca^{2+}	Zn^{2+}	Co^{2+}	Mn^{2+}	Na^{+}	K^{+}
	50 - 55°C	+	±	-	-	±	±	+
	50 - 55°C	+	±	-	-	±	±	+
ja im sauren pH-Bereich (3.1)		-					+	+
nein		+	-			+		+
		+				+	+	+
nein		+	±	-	-	±	±	±
		+		-				-
		+		-				-
ja		±	±	-		±	±	
ja		±	±	-			-	
ja	65°C	-						

Literaturquellen zu Tabelle 3

1) SPAHR, HOLLINGWORTH, 1961
2) SPAHR, 1966
3) SPAHR, 1964
4) ROBERTSON et al., 1968
5) OHTAKA et al., 1963
6) NAKAO et al., 1968
7) LEE et al., 1968
8) EGAMI et al., 1964
9) EGAMI und NAKAMURA, 1969
10) RUSHIZKY, SOBER, 1962
11) UCHIDA, 1966a
12) UCHIDA, 1966b
13) KUNITZ, 1940
14) CHARGAFF, DAVIDSON, 1955
15) HARBERS et al., 1964

Aus den zusammengestellten Eigenschaften der RNasen (Tabelle 3) lassen sich bezüglich der Hitzestabilität, pH-Optima und der Einwirkung einiger Effektoren gewisse Gemeinsamheiten zwischen der RNase aus Hydrogenomonas-Zellen und denen aus anderen Organismen ableiten.

Die Aktivität der RNase aus den Hydrogenomonas-Zellen war bei einem pH-Wert zwischen 7,4 und 7,6 im Testansatz und einer Temperatur zwischen 50 und 55°C im Optimum, sie wurde durch Mg^{2+} (8 - 20 mM), Mn^{2+} (0,8 - 4,0 mM), Na^{+} (20 - 40 mM) und K^{+} (20 - 200 mM) im Testansatz begünstigt, durch Zn^{2+}-Ionen sogar bei geringen Konzentrationen stark gehemmt. Die meisten oben erwähnten RNase-Systeme aus anderen Organismen zeigten ein pH-Optimum zwischen 7 und 8, waren hitzestabil (die RNase aus Candida lipolytica besaß ein Temperatur-Optimum bei 50 - 55°C (IMADA et al., 1972b); sie benötigten für ihre Aktivität fast die gleichen Effektoren (Salze) wie die RNase aus Hydrogenomonas-Zellen; durch Zn^{2+}-Ionen wurde die Aktivität bei fast allen genannten RNasen gehemmt.

Wie bereits erwähnt, wurde die Aktivität der DNase und der Alkalischen Phosphatase im Zellmaterial der Hydrogenomonas-Stämme (H16 und PHB^{-}4) ermittelt. Die beiden Enzyme waren hitzelabil und während der Hitzebehandlung ging der größte Teil ihrer Aktivität verloren.

An dieser Stelle werden einige der ermittelten Eigenschaften für die DNase im Zellmaterial aus nichtbehandelten Zellen erörtert. Die maximale Aktivität der DNase wurde bei einer Temperatur von 35 - 37°C und bei einem pH-Wert zwischen pH 8 und 9 erreicht. Durch Mg^{2+}-Ionen (2,0 - 20 mM $MgSO_4$), K^{+}- und Na^{+}-Ionen (20 - 200 mM KCL und NaCl) im Testansatz wurde sie aktiviert, durch Zn^{2+}-, Ca^{2+}-, Ca^{2+}-, So^{2+}- und Mn^{2+}-Salze auch in geringen Konzentrationen gehemmt. Ob diese DNase aus mehreren DNase-Systemen besteht und ähnliche Eigenschaften besitzt, wie die DNasen aus Escherichia coli (WEISSBACH und KORN, 1963; JORGENSEN und KOERNER, 1966), ist noch nicht ge-

prüft worden. Nach WEISSBACH und KORN (1963) besitzen die E.-coli-Zellen eine Reihe von DNase-Systeme: DNase I, II, III und IV; wobei die DNase I und II extracelluläre, DNase III und IV endocelluläre Enzyme sind. Die pH-Optima für die DNasen I und II beträgt 7 bis 8, für III und IV zwischen pH 8 und 9. Diese DNasen benötigen für ihre Aktivität Mg^{2+}-Ionen, wie die DNase aus Hydrogenomonas-Zellen und auch andere DNasen verschiedener Herkunft (ZAMENHOF und CHARGAFF, 1949; HARBER et al., 1964; ELEY und ROTH, 1966).

Lokalisation der Nukleasen-Aktivität

Aus den Ergebnissen mehrerer Autoren geht hervor, daß sowohl die löslichen Suspensionsmedien oder Fraktionen als auch die Partikel-Fraktionen - insbesondere die Ribosomen-Fraktionen von zahlreichen Mikroorganismen über Ribonuklease-Aktivität verfügen (ELSON, 1958, 1959; BOLTON et al., 1959; SPAHR, 1964; NEU und HEPPEL, 1964a, 1964b, 1964c, 1965; TEUBER, 1966; HEPPEL, 1967; ANDERSON und CARTER, 1965; SINGER und TOLBERT, 1965; LOGAN und SINGER, 1968; ROBERTSON et al., 1968; NAKAO et al., 1968; HIGHT und ORDAL, 1969; IMADA et al., 1972a; MANGIAROTTI und TURCO, 1973 u.a.). Um die Lokalisation der Ribonuklease-Aktivität im Zellmaterial der Hydrogenomonas-Stämme zu erörtern, wird erst die Lokalisation der einzelnen bekannten RNasen (RNase I, II, III) bei verschiedenen Mikroorganismen dargelegt.

1. Lokalisation der Aktivität der RNase

Während die RNase I aus E.coli nach BOLTON et al. (1959), SPAHR und HOLLINGWORTH (1961), TAL und ELSON (1963), KRISHNA et al. (1973), als obligater Bestandteil der 30 S-Ribosomen betrachtet wurde, fanden andere Autoren, daß die RNase I in der Nähe der Zelloberfläche zwischen der Zellwand und der

Zellmembran lokalisiert ist: Erst nach Zerstörung der Zellstruktur bzw. der cytoplasmatischen Membran geht die Aktivität der RNasen zum größten Teil in das Medium (oder im zellfreien Extrakt) über (NEU und HEPPEL, 1964a, 1964b, 1964c, 1965; TEUBER, 1966; HEPPEL, 1967; ABRELL, 1971). Unabhängig von dem zerstörenden Agens (chemische Stoffe - Toluol und ähnliche Stoffe, physikalische - osmotische - oder mechanische Behandlung) wird die freigesetzte RNase wegen ihrer hohen Affinität zu Ribosomen (TAKANAMI, 1967) selektiv an den Ribosomen, bevorzugt an den 30 S-Partikeln, gebunden (NEU und HEPPEL, 1964a, 1965; TEUBER, 1966).

DATTA und BURMA (1972) konnten feststellen, daß die RNase I aus Salmonella typhimurium in latenter Form an 30 S-Ribosomen gebunden ist; in Abwesenheit von Mg^{2+}-Ionen oder bei Vorhandensein von EDTA wird sie aktiviert, wobei die eigene Ribosomen-RNS abgebaut wird.

Daß die 50 S-Ribosomen aus E.coli über Ribonuklease-Aktivität verfügen, ist umstritten: während CERI und MAEBA (1973) feststellen konnten, daß die 50 S-Ribosomen aus E.coli (MRE 600) über RNase-Aktivität verfügten, berichteten TAL und ELSON (1963), daß die 50 S-Partikel aus E.coli keine RNase(I)-Aktivität enthielten. Ob es bei der RNase nach CERI und MAEBA (1973) sich um RNase I handelt, ist jedoch nicht bekannt.

In voneinander unabhängigen Untersuchungen fanden OHTAKA et al. (1963), DANNER und MORGAN (1963), NAKAO et al. (1968) übereinstimmend, daß die Ribosomen-Fraktion aus Hefezellen über RNase-Aktivität verfügt, allerdings ist nicht festgestellt worden, ob es sich bei diesen RNasen um RNase I handelt.

DANNER und MORGAN (1963) konnten in ihren Untersuchungen über die Veränderung der Aktivität der Ribosomen-RNase in Abhängigkeit von der Wachstumsphase der Hefezellen feststellen, daß die spezifische Aktivität der Ribosomen-RNase im

Laufe des Wachstums anstieg und ihr Optimum am Ende der exponentiellen Phase bzw. Beginn der stationären Phase (infolge "alteration" der Ribosomen) erreichte. NAKAO et al. (1968) fanden auch, daß sowohl die Ribosomen als auch die lösliche Fraktion aus den Hefezellen (S. fragilis X S. dobrzhanskii) über RNase-Aktivität verfügten.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen berichteten IMADA et al. (1972a), daß die Ribosomen aus Candida lipolytica keine RNase-Aktivität besaßen, und daß der überwiegende Anteil der RNase-Aktivität in der löslichen Fraktion enthalten ist.

2. Lokalisation der Aktivität der Phosphodiesterase (RNase II)

Die Aktivität der Phosphodiesterase (genannt RNase II nach SPAHR und SCHLESSINGER, 1963; SPAHR, 1964) wurde zum erstenmal von WADE und LOVETT (1961) in der Ribosomen-Fraktion aus E.coli gefunden.

Obwohl festgestellt werden konnte, daß die Ribosomen aus verschiedenen Mikroorganismen über Phosphodiesterase-Aktivität verfügen (WADE und LOVETT, 1961; SPAHR, 1964 bei E.coli; SINGER und TOLBERT, 1965; LOGAN und SINGER, 1968 bei Lactobacillus plantarum), wurde ausgeführt, daß mehr als 80% der gemessenen Phosphodiesterase-Aktivität in der löslichen Fraktion gefunden worden ist (EGAMI und NAKAMURA, 1969). Die Erklärung dieser Tatsache beruht auf der Annahme, daß die Phosphodiesterase locker an den Ribosomen gebunden ist; nach der Dissoziation der Ribosomen in 30 S- und 50 S-Partikeln, statt an den 30 S-Ribosomen gebunden zu werden, wie die RNase I, geht das Enzym in das Suspensionsmedium über (EGAMI und NAKAMURA, 1969).

NAKAO et al. (1968) konnten auch feststellen, daß sowohl die Ribosomen als auch die löslichen Fraktionen aus Hefezellen

über RNase II-Aktivität verfügen. Ob diese RNase gewisse Gemeinsamkeiten bezüglich ihrer Eigenschaften mit der RNase II aus E.coli (SPAHR und SCHLESSINGER, 1963) hat, ist umstritten: während RNase II aus E.coli durch K^+- und Mg^{2+}- oder Mn^{2+}-Ionen aktiviert werden konnte, wurde die RNase II aus den Hefezellen nur noch durch Mg^{2+}-Ionen jedoch nicht durch K^+-Ionen aktiviert. Die Hefe-RNase II spaltet RNS und Polynukleotide nur in Di- und Trinukleotide (2'-,3'-), während die RNase II aus E.coli die RNS und ihre Komponenten in Nukleotid-5'-Phosphate spaltet (SPAHR und SCHLESSINGER, 1963; EGAMI und NAKAMURA, 1969).

3. Lokalisation der Aktivität der RNase III

Die Aktivität der RNase III wurde nach ROBERTSON et al. (1968) intracellulär bei Zellmaterial aus E.coli ermittelt. Das Enzym ist dadurch charakterisiert, daß es die doppelsträngige RNS sowie synthetische Polyribonukleotide in Mono- bzw. Oligonukleotide spaltet.

Wie bei der RNase II ist die RNase III locker an den Ribosomen lokalisiert, somit läßt sie sich aufgrund dieser Eigenschaft leicht isolieren und reinigen.

Aus den vorliegenden Ergebnissen wurde geschlossen, daß die Zellen der untersuchten Hydrogenomonas-Stämme über Nuklease-Aktivität verfügen. Besonders wurde die Bildung bzw. Aktivierung der RNase und in geringerem Maße der Phosphodiesterase durch das erprobte Hitzebehandlungsverfahren (Hitzeschock bei 65°C für 10 min gefolgt mit einer zweistündigen Nachinkubation bei 50 - 55°C) ausgelöst, während die Aktivität anderer Nukleasen (DNase und Alkalische Phosphate) stark beeinträchtigt wurde. Deswegen und wegen der spezifisch degradierenden Einwirkung der RNase und möglicherweise der Phosphodiesterase dieser Bakterien auf die zelleigene RNS während der Hitzebe-

handlung bedarf die Lokalisation der Aktivität beider Enzyme einer Erörterung.

a. Lokalisation der Aktivität der RNase aus Hydrogenomonas-Zellen

Ob die im Zellmaterial der Hydrogenomonas-Bakterien gefundene RNase aus einem oder mehreren RNase-Systemen besteht, wie die bereits erwähnten RNasen aus anderen Organismen, wurde nicht geprüft. Im allgemeinen war sie relativ hitzestabil, ihre Aktivität (E/mg Protein) wurde anhand der spezifischen Einwirkung des Rohextraktes (Enzym) auf die RNS (sowohl der zelleigenen RNS als auch Hefe-RNS) ermittelt. Wegen des fast vollständigen RNS-Zerfalls (s. Ergebnisse; Kapitel 5.) ist es anzunehmen, daß diese RNase aus einem Gemisch von mehr als einem RNase-System besteht.

Woraus auch immer die RNase bestehen mag, ob sie aus einem oder mehreren Systemen besteht, so war es in diesem Zusammenhang interessant festzustellen, daß zwischen den bereits dargelegten Verhältnissen bei anderen Mikroorganismen und den an Hydrogenomonas gewonnenen Versuchsergebnissen gewisse Gemeinsamkeiten bestehen darin, daß die Aktivität der RNase-Systeme - abgesehen von der RNase I, die an 30 S-Partikeln möglicherweise lokalisiert ist oder wieder gebunden wird (SPAHR und HOLLINWORTH, 1961; TAL und ELSON, 1963; NEU und HEPPEL, 1964a, 1965; TEUBER, 1966) - in der löslichen Fraktion gefunden worden ist, während an Partikel-Fraktionen nur ein geringer Anteil gebunden bleibt. Auch im Zellmaterial der Hydrogenomonas-Zellen besaßen die löslichen Fraktionen im allgemeinen die höchste RNase-Aktivität, während die Partikel-Fraktionen (Ribosomen und Membranen) nur über einen geringen Teil verfügten (Abbildung 25). In den löslichen Fraktionen der vollinduzierten Zellen war die Aktivität (E/mg Protein) sogar viel höher als die in den gleichen Fraktionen von Zellen ohne Behandlung; Partikel-Fraktionen zeigten jedoch ein umgekehr-

tes Bild. Interessant ist der Befund, daß die Ribosomen-RNase (aus nicht behandelten PHB⁻4-Zellen) durch die Hitzebehandlung (Hitzeschock für 10 min bei 65°C nachfolgend mit einer Inkubationsstunde bei 50°C) aktiviert werden konnte. Diese RNase hat die Hydrolyse sowohl der eigenen Ribosomen-RNS als auch der zugesetzten Hefe-RNS bewirkt (Tabelle 1). Ähnliche Befunde sind bereits von SCHELL (1966), HAIGHT und ORDAL (1969) mitgeteilt worden. Bei den von ihnen untersuchten Mikroorganismen wurde die Ribosomen-RNase durch eine Hitzebehandlung aktiviert und dabei die Hydrolyse der eigenen Ribosomen-RNS hervorgerufen.

b. Lokalisation der Aktivität der Phosphodiesterase aus Hydrogenomonas-Zellen

Die Aktivität der Phosphodiesterase wurde durch die Einwirkung der zellfreien Extrakte auf reines bis-p-Nitrophenylphosphat bestimmt. Welcher Wirkungsmechanismus bei dem RNS-Zerfall bzw. welche Eigenschaften das Enzym besaß, wurden nicht ermittelt. Ähnlich wie bei der Lokalisation der Aktivität der RNase war der höchste Anteil der Aktivität der Phosphodiesterase in den löslichen Fraktionen, insbesondere aus vollinduzierten Zellen zu finden. Die Partikel-Fraktionen enthielten relativ geringe Phosphodiesterase-Aktivität.

Die Lokalisation der Aktivität der übrigen Nukleasen (DNase und alkalische Phosphate) war in großem Umfang identisch wie bei der Verteilung der Aktivität der RNase und Phosphodiesterase. Wiederum enthielten die löslichen Fraktionen im allgemeinen den höchsten Anteil der Aktivität, während die Partikel-Fraktionen nur einen geringen Anteil besaßen.

Die Frage, an welcher der Partikel-Fraktionen (Ribosomen, Membranen oder an beiden) bzw. an welchen Ribosomen-Untereinheiten und nicht zuletzt in welcher Anordnung überhaupt im Cytoplasma die RNase und andere Nukleasen vor der Zerstörung der

Zellordnung ursprünglich vorlagen, läßt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht beantworten.

Die Befunde stehen jedoch mit der Vorstellung im Einklang, daß die Nukleasen: RNase, Phosphodiesterase, Alkalische Phosphatase und DNase, bei Hydrogenomonas-Zellen möglicherweise partikelgebunden oder im Cytoplasma in noch ungeklärter Weise angeordnet sind. Erst nach der Zerstörung der ursprünglichen Zellstruktur durch die Hitzebehandlung bzw. durch Zellaufschluß, geht die Aktivität der genannten Nukleasen zum größten Anteil in die lösliche Fraktion über.

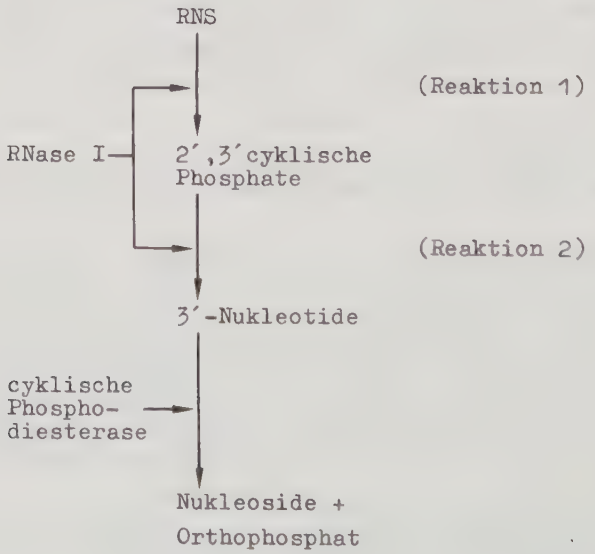
Diese Vorstellung steht somit im Einklang mit der Vorstellung von NEU und HEPPEL (1964a, 1965), TEUBER (1966) und von anderen Autoren, daß die Ribonukleasen (RNase und Phosphodiesterase) mehr oder weniger an den im Zellmaterial befindlichen Partikel-Fraktionen oder in bestimmter Anordnung in der Zelle (z.B. zwischen Zellwand und der Zellmembran) lokalisiert sind, und daß durch Zerstörung der Zellstruktur bzw. Dissoziation der Ribosomen unabhängig von der zerstörenden Agens die Aktivität der Ribonukleasen zum größten Teil in das Suspensionsmedium (oder in die lösliche Fraktion) übergeht.

Nachweis der RNS-Abbauprodukte aus Zellen des Stammes PHB^{-}4

Es ist bekannt, daß die RNase I aus E.coli die RNS bzw. Polynukleotide in Nukleosid-3'-Phosphate spaltet (SPAHR und WOLLINGWORTH, 1961; TAL und ELSON, 1963; EGAMI und NAKAMURA, 1969). SPAHR und WOLLINGWORTH (1961) fanden, daß die RNase schrittweise die RNS in Nukleosid-3'-Phosphate spaltet: primär in 2',3'-cyklische Phosphate, anschließend in Nukleosid-3'-Phosphate. Die erste Reaktion verläuft viel schneller als die zweite, so daß im Gemisch der zersetzten RNS die meisten RNS-Komponenten (Oligonukleotide, 2',3'-cyklische Phosphate, Nukleosid-3'-Phosphate, Nukleoside und Orthophosphat) gefunden worden sind.

TEUBER (1966) gelangte zu ähnlichen Ergebnissen bei dem enzymatisch bedingten RNS-Zerfall nach Behandlung der E.coli-Zellen mit Toluol; wobei die RNase I auch primär die RNS in 2',3'-cyklische Phosphate und diese dann in 3'-Nukleotide spaltet; die 3'-Nukleotide werden weiter durch 3'-Nukleotidasen (cyklische Phosphodiesterase von ANRAKU, 1964) in Nukleoside, Basen und Orthophosphat gespalten. MARUYAMA und MIZUNO (1965), ANRAKU und MIZUNO (1965) konnten feststellen, daß die Spaltung der RNS durch die gleichzeitige Einwirkung der beiden Enzymsysteme RNase und cyklische Phosphodiesterase viel effektiver ist als durch die RNase als einzigem degradierenden Enzym. Nach diesen Autoren spaltet die RNase die RNS in Oligonukleotide (2',3'-cyklisches Phosphat), die anschließend durch die cyklische Phosphodiesterase in Nukleoside und Orthophosphat gespalten werden.

Das folgende Schema stellt die bereits beschriebenen Abbauvorgänge der RNS bzw. die dazu eingewirkten Enzyme zusammenfassend dar:



Auch RUSHIZKY und SOBER (1962a, 1962b) fanden, daß zumindest die erste Reaktion (Schema) durch die RNase I, aus Aspergillus oryzae bewirkt werden konnte. Zu den gleichen Ergebnissen kamen auch YAMASAKI und ARIMA (1969, 1970), wobei die aus Bacillus subtilis isolierte RNase, die Hydrolyse der RNS in Cytidin 2′, 3′-, Uridin 2′, 3′- und Guanosin 2′, 3′-Phosphate bewirkte.

DANNER und MORGAN (1963), OHTAKA et al. (1963) konnten feststellen, daß auch die Hefe-RNase (aus Saccharomyces cervisia) die Hydrolyse der RNS in Nukleosid-2′ und oder -3′-Phosphate (AMP, GMP, CMP, UMP) bewirkte.

Daß auch andere Ribonukleasen an dem RNS-Zerfall beteiligt sind, ist bereits mehrfach betont worden. WADE und LOVETT (1961); SPAHR und SCHLESSINGER (1963); SPAHR (1964); LOGAN und SINGER (1968), EGAMI und NAKAMURA (1969) haben gezeigt, daß die RNase II (Phosphodiesterase) die Hydrolyse der RNS in Nukleosid-5′-Phosphate hervorruft.

ROBERTSON et al. (1968), RAY und BURMA (1970) fanden, daß die RNase III der Zerfall der doppelsträngigen RNS und Polyribonukleotide in Mono- bzw. Olignukleotide bewirkte.

Aus den bei PHB^{-}4-Zellen erhobenen Ergebnissen geht hervor, daß die durch die Hitzebehandlung aktivierten Ribonukleasen (Phosphodiesterase inbegriffen) die Hydrolyse der zelleigenen RNS in ihren Komponenten bewirkten. Im Gemisch der freigesetzten RNS-Abbauprodukte, getrennt durch Dünnschicht-Chromatographie, konnten fast alle RNS-Komponenten nachgewiesen werden (Abbildung 29). Besonders hervorzuheben waren die Komponenten AMP, CMP, CDP, UDP, Adenosin, Cytidin und Uridin: etwas im geringen Anteil die Komponente GDP, ATP, CTP, UTP, Guanin und Ribose, getrennt worden. Die anderen RNS-Komponenten waren nur in geringer Menge vorhanden und konnten nicht deutlich getrennt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse gestatten noch keine Aussage darüber, wie weit der Abbauvorgang der RNS verlaufen ist und in welchem Ausmaß jedes der degradierenden Ribonuklease-Systeme an diesem RNS-Zerfall beteiligt sein kann, da eine quantitative Trennung der freigesetzten RNS-Komponente in diesem Fall nicht vorgenommen und die degradierende Einwirkung der Ribonukleasen im Einzelnen nicht ermittelt wurden. Es konnte jedoch anhand der vorliegenden Ergebnisse verglichen werden mit den bereits zitierten Ergebnissen bei anderen Mikroorganismen - d.h. der RNS-Zerfall kann durch verschiedene RNase-Systeme bewirkt werden, wobei unterschiedliche Spaltprodukte zur Folge sind - angenommen werden, daß auch der fast vollständige Zerfall der RNS bei PHB$^-$4-Zellen nur durch ähnliche RNase-Systeme möglich gewesen war.

Wie immer der enzymatisch bedingte Abbauvorgang der RNS bei PHB$^-$4-Zellen sei, der in diesem Zusammenhang durch die Hitzebehandlung in Gang gesetzt worden ist, besteht das Interesse an den ausgeschiedenen RNS-Komponenten daran, daß einige dieser Komponenten, anstatt als Abfallprodukte nach der Hitzebehandlung zu betrachten, gereinigt für Ernährungs- bzw. medizinische Zwecke eingesetzt werden konnten.

Die Gewinnung von solchen Komponenten (GMP, IMP, XMP, AMP umgewandelt in IMP) durch die enzymatische Hydrolyse von Hefe-RNS sowie dessen Verbrauch für Ernährungszwecke (als Geschmackverbessernde Stoffe) bzw. für medizinische Zwecke ist bereits an mehreren Stellen demonstriert worden (KUNINAKA et al., 1964; SCHIMAZONO, 1964; DEMAIN, 1968).

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Hydrogenomonas eutropha-Stamm H16 Wildtyp und die davon abgeleitete Mutante PHB^-4 sind befähigt, sowohl heterotroph als auch autotroph (Gasgemisch von 70 - 80% H_2, 10 - 20% O_2 und 10% CO_2) zu wachsen. Die Verdopplungszeit beträgt 140 bis 150 min unter autotrophen und 90 min unter heterotrophen Wachstumsbedingungen. Der Gehalt der Bakterien an Protein kann bis zu 60 oder 70% Protein vom Trockengewicht betragen. Der Gehalt an Nukleinsäuren, insbesondere an RNS (13 - 16% vom Trockengewicht) ist außerordentlich hoch.

2. Zur Herabsetzung des Nukleinsäure-Gehaltes der Zellen wurde ein Hitzebehandlungsverfahren entwickelt, bestehend aus einer Hitzeschockbehandlung und einer Nachbehandlung. Zur Optimierung wurden die Temperaturen und die Einwirkungszeiten der erhöhten Temperatur variiert. Für die Hitzeschockbehandlung wurden Temperaturen von 45 bis 70°C angewandt und 10 sec, 1, 5 und 10 min einwirken gelassen. Für die Nachbehandlung wurden die Temperaturen auch zwischen 45 und 70°C variiert und die Einwirkungszeiten für 0 bis 180 min. In allen Fällen wurde die Freisetzung von Nukleinsäureabbauprodukten am Auftreten von UV-absorbierenden Material im Suspensionsmedium verfolgt. Zu einem weitgehenden Abbau erwiesen sich folgende Verfahrensschritte geeignet:
   a) Hitzeschockvorbehandlung für 10 min bei 65°C,
   b) Hitzenachinkubation für die Dauer von 2 Std. bei 50°C.

   Durch diese Hitzebehandlung wurden mehr als 90% des gesamten RNS-Gehaltes (Herabsetzung des RNS-Gehaltes von 13% vom Trockengewicht auf weniger als 1,5% vom Trockengewicht) in Hydrogenomonas-Zellen entfernt, ohne jedoch den Proteingehalt zu verringern. Der Gehalt an DNS wurde durch dieses Hitzebehandlungsverfahren nicht herabgesetzt.

3. Der Abbauvorgang der RNS durch die Hitzebehandlung ist enzymatisch bedingt. Enzymatische Untersuchungen haben ergeben, daß durch die Hitzeschockvorbehandlung (10 min bei 65°C) die RNase und zum Teil die Phosphodiesterase aktiviert wurden, und daß die RNS-Hydrolyse bzw. die Freisetzung von RNS-Abbauprodukten (E.260 nm im Suspensionsmedium) während der Nachinkubation (2 Std. bei 50°C) erfolgte. Die anderen Nukleasen (DNase und Alkalische Phosphatase) wurden durch die Hitzebehandlung zum größten Teil inaktiviert. Dieser Befund der DNase-Inaktivierung erklärt die Tatsache, warum der DNS-Gehalt während der Hitzebehandlung keine Veränderung erfuhr.

   Die Nukleasen-RNase und Phosphodiesterase waren hitzestabil. Die Aktivität der RNase war bei einer Temperatur zwischen 50 und 55°C bzw. einem pH-Wert zwischen 7,4 und 7,6 (im Testansatz) im Optimum. Durch die Metallionen Mg^{2+} (8 - 20 mM), Mn^{2+} (0,8 - 4,0 mM), K^{+} (20 - 200 mM), Na^{+} (20 - 40 mM) und Ca^{2+} (4 - 20 mM) - Konzentrationen im Testansatz - wurde die Aktivität der RNase begünstigt, durch Zn^{2+}- und Co^{2+}-Ionen jedoch (auch in kleinen Konzentrationen) stark gehemmt. Die Aktivität der DNase wurde auch durch die Metallionen Mg^{2+} (2,0 - 20 mM), K^{+} und Na^{+} (20 - 200 mM) im Testansatz begünstigt, jedoch durch Mn^{2+}-, Co^{2+}-, Ca^{2+}-, Zn^{2+}-Ionen auch bei kleinen Konzentrationen sehr stark gehemmt. Die Aktivität der DNase war im Optimum bei einer Temperatur von 37°C; bei erhöhten Temperaturen geht die Aktivität sehr stark zurück.

4. Die Lokalisation der Nukleasen in Fraktionen sowohl der hitzebehandelten als auch der nicht-hitzebehandelten Zellen wurde anhand der Verteilung von Malat-Dehydrogenase als Indikator für ein lösliches Enzym und von NADH-Oxydase für ein partikelgebundenes Enzym ermittelt. Im allgemeinen besaßen die löslichen Fraktionen den größten Anteil an Nukleasen-Aktivität, während die Partikel-Fraktionen einen relativ geringen Anteil enthielten. Die spezifische Aktivi-

tät der RNase und Phosphodiesterase war in den löslichen Fraktionen von hitzebehandelten Zellen höher als die in derselben von nicht-hitzebehandelten Zellen.

5. Die durch die Hitzebehandlung aktivierten Ribonukleasen (RNase und Phosphodiesterase) bewirkten die Hydrolyse der zelleigenen RNS. Im Gemisch der freigesetzten RNS-Abbauprodukte, getrennt durch Dünnschicht-Chromatographie, konnten fast alle RNS-Komponenten nachgewiesen werden. Besonders waren AMP, CMP, CDP, UDP, Adenosin, Cytidin und Uridin deutlich getrennt, die übrigen Komponenten waren nur schwach sichtbar oder nicht scharf getrennt worden.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

ABRELL, J.W. 1971 Ribonuclease I released from Escherichia coli by osmotic shock Arch.Biochem. and Biophys., 142, 693 - 700.

AGGAG, M.
SCHLEGEL, H.G. 1973 Studies on a gram-positive hydrogen bacterium, Nocardia opaca strain 1 b: 1. Description and physiological characterization. Arch.Mikrobiol. 88, 299 - 318.

ANDERSEN, J.H.
CARTER, C.E. 1965 Acid-soluble ribosomal ribonuclease of Escherichia coli Biochem. 4, 1102 - 1108.

ANRAKU, Y. 1964 A new cyclic phosphodiesterase having a 3'-nucleotidase activity from Escherichia coli B. I. purification and some properties of the enzyme. J.Biol.Chem. 239, 3412 - 3419.

ANRAKU, Y.
MIZUNO, D. 1965 A ribonuclease from the debris of E.coli. Biochem.Biophys.Res.Commun. 18, 462 - 468.

BEISENHERZ, G.
BOLZE, H.
BÜCHER, Th.
CZOK, R. et al. 1953 Diphosphofructosealdolase, Phosphoglyceraldehyd-DH, Milchsäure-DH, Glycerophosphat-DH und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z.Naturf. 8b, 555 - 577.

BOLTON, E.T.
BRITTEN, R.J.
COWIE, D.B.
McCARTHY, B.J.
McQUILLEN, K.
ROBERTS, R.B. 1959 In Carnegie Inst. of Washington Yearbook, p. 259 (Carnegie Inst. of Washington, Ann. Rep.)

BUNKER, H.R. 1969 Summary of contributed papers. Biotech.Bioengen.Symposium, 1, 123 - 124.

BURTON, K. 1956 A study of the conditions and mechanism of the diphenylaminereaktion for the colorimetric estimation of DNA. Biochem.J. 62, 315 - 322.

CALLOWAY, D.H. 1969 Protein quality of the bacterium
KUMAR, A.M. Hydrogenomonas eutropha.
Appl.Microbiol. 17, 176 - 178.

CANERA, A. 1972 A method for large reduction of the
PIEBER, M. nucleic acid content of yeast.
ROMERO, C. Biotech.Bioengen. 14, 173 - 177.
TOHA, J.C.

CASTRO, A.C. 1971 Reduction of nucleic acid content in
SINSKEY, A.J. Candida yeast cells by bovine pan-
TANNENBAUM, S.R. creatic ribonuclease A treatment.
Appl.Microbiol. 22, 422 - 427.

CERI, H. 1973 Association of RNase with the 50-S
MAEBA, P.Y. ribosomal subunit of Escherichia coli MRE 600.
Biochim.Biophys.Acta 312, 337 - 348.

CHAKRABURTTY, K. 1968 The purification and properties of
BURMA, D.P. a ribonuclease from Salmonella typhimurium extrakt.
J.Biol.Chem. 243, 1133 - 1139.

CHARGAFF, E. 1955 The nucleic acids, Vol. II,
DAVIDSON, J.N. Acad. Press, New York.

COONEY, C.L. 1972 Microbial utilization of methanol.
LEVINE, D.W. Advances in Appl.Microbiol. 15, 337 - 365, ed. by D. Perlman, Acad. Press, New York, London.

DANNER, J. 1963 Ribosomal RNase activity as a
MORGAN, R.S. function of growth phase in yeast.
Biochim.Biophys.Acta, 76, 652 - 655.

DATTA, A.K. 1972 Association of RNase I with ribosomes
BURMA, D.P. and their subunits.
J.Biol.Chem. 247, 6795 - 6801.

DEMAIN, A.L. 1968 Production of purine nucleotides by fermentation
Progr.in Industr.Microbiol. 8, 35 - 72.

von DIJK-SALKINOJA, M.S.
PLANTA, R.J. 1971 Rate of ribosome production in Bacillus licheniformis.
J.Bacteriol. 105, 20 - 27.

DIRR, K.
DECKER, P. 1944 Über den Nichteiweiß-Stickstoff der Hefe. II. Die Zusammensetzung der Purinfraktion und die Extraktion der Nukleinsäuren.
Biochem.Z. 316, 249 - 254.

EDOZIEN, J.C.
UDO, U.U.
YOUNG, V.R.
CRISMSCHAW, N.S. 1970 Effect of high levels of yeast feeding on uric acid metabolism of youngmen.
Nature, 228, 180.

EGAMI, F.
TAKAHASHI, K.
UCHIDA, T. 1964 Ribonucleases in Takadiastase : chemical nature and applications; in progr. in nucleic acid res. and mol. biol. edited by Davidson, J.N., and W.E. Cohn, Acad. Press, New York und London, 3, 59 - 101.

EGAMI, F.
NAKAMURA, K. 1969 Microbial ribonucleases.
Springer-Verlag, New York, London, Heidelberg.

ELEY, J.
ROTH, Y.S. 1966 Partial purification and properties of nuclease from chicken pancreas.
J.Biol.Chem. 241, 3063 - 3069.

ELSON, D. 1958 Latent ribonuclease activity in a ribonucleoprotein.
Biochim.Biophys.Acta 27, 216 - 217.

ELSON, D. 1959 Latent enzymic activity of a ribonucleoprotein isolated from Escherichia coli.
Biochim.Biophys.Acta 36, 281 - 284.

FAO, Protein Advisory Group 1970 Single cell protein. PAG Guideline No. 4 FAO/WHO/UNICEF Protein Advisory Group.

FENCL, Z. 1966 Production of microbial protein from carbon sources. Biotech.Bioeng.Symposium, 1, 63 - 70.

FOSTER, J.F. 1964 A continuous culture apparatur for
LITCHFIELD, J.H. the microbial utilization of hydrogen produces by eletrolysis of water in closed-cycle space systems. Biotech.Bioengen.6, 441 - 456.

GAMBLE, W. 1965 Effect of nucleotide 5'-di- and 5'-
WRIGHT, L.D. tri-phosphates on pancreatic RNase activity. Biochem.J. 97, 340 - 344.

GOULD, R.F. 1966 World protein resources. Advances in chemistry series, 57; American chemical society publications, Washington, USA.

HAIGHT, R.D. 1969 Thermally induced degradation of
ORDAL, Z.J. staphylococcal ribosomes. Can.J.Microbiol. 15, 15 - 19.

HAMER, G. 1969 Methane fermentation for food. Biotech.Bioengen.Symposium 1, 119 - 121.

HARBERS, E. 1964 Die Nukleinsäuren.
DOMAGK, G.F. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart.
MUELLER, W.

HEDENSKOG, G. 1972 Reduction of the nucleic acid content
EBBINGHAUS, L. of "Single-Cell Protein" concentrates. Biotech.Bioengen. 14, 447 - 457.

HEDENSKOG, G. 1973 Some methods for processing of
MOGREN, H. "Single-Cell Protein". Biotech.Bioengen. 15, 129 - 142.

HERBERT, D. 1971 Chemical analysis of microbiol cells.
PHIPPS, P.J. Methods in Microbiol. 5B, 210 - 336,
STRANGE, R.E. Acad. Press, London, New York.

HEPPEL, L.A. 1967 Selective release of enzymes from bacteria. Science, 156, 1451 - 1455.

HUXLEY, H.E. ZUBAY, G. 1960 Electron microscope observations on the structure of microsomal particles from Escherichia coli. J.Mol.Biol. 2, 10 - 18.

IMADA, A. SINSKEY, A.J. TANNENBAUM, S.R. 1972a Degradation of ribonucleic acid in Candida lipolytica: Extraction of ribonucleic acid degrading enzymes. Biotech. Bioengen. 14, 103 - 122.

IMADA, A. SINSKEY, A.J. TANNENBAUM, S.R. 1972b Ribonucleic acid degradation in Candida lipolytica. Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today, 544 - 561.

IRIE, M. 1969a pH-Profiles of the kenetic parameters of ribonuclease from Aspergillus saitoi. J. Biochem. 65, 133 - 140.

IRIE, M. 1969b Inhibition of ribonuclease from Aspergillus saitoi by nucleosides. J.Biochem. 65, 907 - 913.

JORGENSEN, S.E. KOERNER, J.F. 1966 Seperation and characterization of desoxyribonucleases of Escherichia coli B. I. Chromatographic seperation and properties of two desoxyribooligonucleotidases. J.Biol.Chem. 241, 3090 - 3096.

JEROSALIMSKY, N.D. ZAIZEVA, G.N. KHMEL, I.A. 1962 A study of physiology of Azotobacter vinelandii under the conditions of a flow culture. Microbiologiya 31, 417 - 423.

KIHLBERG, R. 1972 The microbe as a source of food. Ann. Review of Microbiol. 26, 427 - 466.

KÖNIG, C.
KALTWASSER, M.
SCHLEGEL, H.G.
1966 Die Bildung von Ureasen nach Verbrauch der äußeren N-Quelle bei Hydrogenomonas H16. Arch.Microbiol. 53, 231 - 241.

KRISHNA, R.V.
MEYHACK, B.
KO, T.S.
APIRON, D.
1973 On the localization of ribonucleases in bacteria. FEBS-Letters, 29, 105 - 108.

KUNINAKA, A.
KIBI, M.
SAKAGUCHI, K.
1964 History and development of flavor nucleotides. Food Technol. 18, 29 - 35.

KUNITZ, M.
1940 Crystalline ribonuclease. J.Gen.Physiol. 24, 15 - 32.

KURLAND, C.G.
1966 The requirements for specific RNA binding by ribosomes. J.Mol.Biol. 18, 90 - 108.

LAFFERTY, R.M.
OEDING, V.
ROBRA, K.G.
SCHLEGEL, H.G.
1973 Fermentationstechnik mit Knallgasbakterien. Dechema-Monographie, 71, 37 - 52, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, BRD.

LANG, K.
RANKE, O.F.
1950 Stoffwechsel und Ernährung. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.

LANG, K.
SCHAEFFNER, E.
1963 Die thermische Behandlung von RNS und deren ernährungsphysiologische Bedeutung. Z.Ernährungswiss. 4, 235 - 245.

LA-RIVIERE, J.W.M.
1958 On the microbial metabolism of the tartaric acid isomers. Diss. Delft.

LEE, S.
NAKAO, Y.
BOCK, A.M.
1968 The nucleases of yeast. II. Purification, properties and specifity of an endonuclease from yeast. Biochim.Biophys.Acta 151, 126 - 136.

LITCHFIELD, J.H. 1972 The mass cultivation of Hydrogenomonas eutropha in submerged culture. Developments in Industrial Microbiology, 13, 317 - 331.

LOGAN, D.M.
SINGER, M.F. 1968 The processive degradation of individual polyribonucleotide chains. J.Biol.Chem. 243, 6161 - 6166.

MAALØE
KJELDGAARD, N.O. 1966 Control of macromolecular synthesis. W.A.Benjamin, New York.

MANGIAROTTI, G.
TURCO, E. 1973 Ribonuclease activity in Escherichia coli polyribosomes. Eur.J.Biochem. 38, 507 - 515.

MATELES, R.I.
TANNENBAUM, S.R. 1968 "Single-Cell Protein, the M.I.T. Press, Cambridge, USA.

MAUL, S.B.
SINSKEY, A.J.
TANNENBAUM, S.R. 1970 New process for reducing the nucleic acid content of yeast. Nature, 228, 181.

MEADOWS, D. 1972 Die Grenzen des Wachstums. Deutsche Verlags-Anstalt, Stuttgart.

MILLER, S.A. 1968 Natritional factors in "Single-Cell Protein". ed. Mateles und Tannenbaum, 79 - 89, M.I.T. Press, Cambridge, USA.

NAKAO, Y.
LEE, S.Y.
HALVORSON, H.O.
BOCK, A.M. 1968 The nucleases of yeast. I. Properties and variability of ribonucleases. Biochim.Biophys.Acta, 151, 114 - 125.

NEHRING, K. 1972 Lehrbuch der Tierernährung und Futtermittelkunde. 9. Aufl., J.Neumann-Neudamm, Berlin.

NEU, H.C.
HEPPEL, L.A. 1964a Some observations on the "latent" ribonuclease of Escherichia coli. Proc.Natr.Acad.Sci.USA, 51, 1267 - 1274.

NEU, H.C.
HEPPEL, L.A. 1964b The release of RNase into the medium when E.coli cells are converted to spheroplasts. J.Biol.Chem. 239, 3893 - 3900.

NEU, H.C.
HEPPEL, L.A. 1964c On the surface localization of enzymes in E.coli Biochim.Biophys.Res.Commun. 17, 215 - 219.

NEU, H.C.
HEPPEL, L.A. 1965 The release of enzymes from E.coli by osomotic shock and during formation of spheroplasts. J.Biol.Chem. 240, 3685 - 3692.

OHTA, S.
MAUL, S.
SINSKEY, A.J.
TANNENBAUM, S.R. 1971 Characterization of a heat shock. Process for reduction of the nucleic acid content of Candida utilis. Appl.Microbiol. 22, 415 - 421.

OHTAKA, Y.
UCHIDA, K.
SAKAI, T. 1963 Purification and properties of RNase from yeast. J.Biochem., Tokyo, 54, 322 - 327.

PFENNIG, N.
LIPPERT, K.D. 1966 Über das Vitamin B_{12}-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. Arch.Mikrobiol. 55, 245 - 256.

RANDERATH, K. 1961a Dünnschicht-Chromatographie von Nukleinsäure-Derivaten an Anionenaustauscherschichten. Angew.Chem. 73, 436.

RANDERATH, K. 1961b Dünnschicht-Chromatographie an Ionenaustauscherschichten: Trennung von Nukleinsäure-Derivaten. Ange.Chem. 73, 674 - 676.

RANDERATH, K. 1962 Dünnschicht-Chromatographie von Nukleotiden. Ange.Chem. 74, 484 - 488.

RANDERATH, K. 1963 Seperation of Deoxyribonucleotides from ribonucleotides by anion-exchange thin-layer chromatography. Biochim.Biophys.Acta 76, 622 - 624.

RANDERATH, K. 1965 Dünnschicht-Chromatographie, 2. Aufl., Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße.

RAY, R.K.
BURMA, D.P. 1970 Partial purification and properties of a K^+- and Mg^{2+}-dependent phosphodiesterase from Salmonella typhimurium. Biochim.Biophys.Acta, 212, 102 - 110.

REIFF, F.
KAUTZMANN, R.
LUEERS, H.
LINDEMANN, M. 1960 Die Hefen; Band I "Die Hefen in der Wissenschaft", Band II "Technologie der Hefen". Verlag Hans-Carl, Nürnberg.

REPASKE, R. 1962 Nutritional requirements for Hydrogenomonas eutropha. J.Bacteriol. 83, 418 - 422.

REPASKE, R. 1966 Characteristics of hydrogen bacteria. Biotech.Bioengen. 8, 217 - 235.

ROBERTSON, H.D.
WEBSTER, R.E.
ZINDER, N.D. 1968 Purification and properties of RNase III from Escherichia coli. J.Biol.Chem. 243, 82 - 91.

RUSHIZKY, G.W.
SOBER, H.A. 1962a Characterization of the major compounds in RNase T_1 digests of RNA. I. mono-, di-,and trinucleotides. J.Biol.Chem.237, 834 - 840.

RUSHIZKY, G.W.
SOBER, H.A. 1962b Characterization of the major compounds in RNase T_1 digests of RNA. II. Tetranucleotides. J.Biol.Chem. 237, 2882 - 2888.

SCHELL, P.L. 1966 Separation and recombination of ribosomal ribonuclease from ribosomes. Nature, 210, 1157 - 1158.

SCHIMAZONO, H. 1964 Distribution of 5'-ribonucleotides in foods and their application to foods. Food Technol. 18, 36 - 45.

SCHLEGEL, H.G.
KALTWASSER, H.
GOTTSCHALK, G.
1961 Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen.
Arch. Mikrobiol. 38, 209 - 222.

SCHLEGEL, H.G.
1968 Bioregeneration im geschlossenen System mit Hilfe von Elektrolysegas und Bakterien, BMwF - FBW 68 - 46, Zentralstelle für Luftfahrtdokumentation und -information (ZLDI), München.

SCHLEGEL, H.G.
1969 From electricity via water electrolysis to food.
Fermentation Advances, Acad.Press Inc., New York, 807 - 819.

SCHLEGEL, H.G.
CLAUS, D.
LAFFERTY, R.M.
1969 Mikroorganismen im Dienste der menschlichen Ernährung.
Zentrb.f.Bakteriol., Parasitenk., Infektionskrankheiten und Hygiene; Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart, 212, 303 - 317.

SCHLEGEL, H.G.
LAFFERTY, R.M.
KRAUSS, I.
1970 The isolation of Mutants not accumulating poly-B-hydroxybutric acid.
Arch. Mikrobiol. 71, 283 - 294.

SCHLEGEL, H.G.
LAFFERTY, R.M.
1971 Noval energy and carbon sources.
A. The production of biomass from hydrogen and carbon dioxide.
Advances in biochemical engeniering, 1, 143 - 168, Springer-Verlag, Berlin.

SCHLENK, F.
DAINKO, J.L.
1965 Action of ribonuclease preperations on variable yeast cells and spheroplasts.
J.Bacteriol. 89, 428 - 436.

SCHMIDT, K.
LIAAEN-JENSEN, S.
SCHLEGEL, H.G.
1963 Die Carotinoide der Thiorhodaceae.
1. Okenon als Hauptcarotinoid von Chromatium okenii perty.
Arch.Mikrobiol. 46, 117 - 126.

SCHORMUELLER, J. 1965 Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Band I, Teil I, "Die Bestandteile der Lebensmittel", Springer-Verlag Berlin.

SINGER, M.F. TOLBERT, G. 1965 Purification and properties of a potassium-activated phosphodiesterase (RNase II) from E.coli. Biochem. 4, 1319 - 1330.

SOUCI, S.W. FACHMANN, W. KRAUT, H. 1962 Die Zusammensetzung der Lebensmittel. Wissenschaftliche Verlagsanstalt, Stuttgart.

SPAHR, P.F. HOLLINGWORTH, B.R. 1961 Purification and mechanism of action of ribonuclease from E.coli ribosomes. J.Biol.Chem. 236, 823 - 831.

SPAHR, P.F. SCHLESSINGER, D. 1963 Breakdown of messinger ribonucleic acid by a potassium-activated phosphodiesterase from E.coli. J.Biol.Chem. 238, 493 - 495.

SPAHR, P.F. 1964 Purification and properties of ribonuclease II from E.coli. J.Biol.Chem. 239, 3716 - 3726.

SPAHR, P.F. 1966 The isolation, assay, and properties of RNase I from E.coli. In: Procedures in nucleic acid research, 64 - 70, ed. by Cantoni, G.L., and D.R. Davies, New York and London: Harper and Row, Publ.

STAHL, E. 1967 Dünnschicht-Chromatographie, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin.

STEVENS, L. MORRISON, M.R. 1968 Studies on the role of polyamines associated with the ribosomes from Bacillus stearothermophilus. Biochem.J. 108, 633 - 640.

TAL, M.
ELSON, D. 1963 The location of ribonuclease in Escherichia coli. Biochim.Biophys.Acta 76, 40 - 47.

TAKAI, N.
UCHIDA, T.
EGAMI, F. 1966 Purification and properties of RNase N_1. An extracellular RNase of Neurospora crassa. Biochim.Biophys.Acta 128, 218 - 220.

TAKAI, N.
UCHIDA, T.
EGAMI, F. 1967 Ribonuclease, phosphodiesterases and phosphomonoesterase of Neurospora crassa in various culture conditions. J.Japan.Biochem.Soc., Seikagaku, 39, 285 - 290.

TAKANAMI, M. 1967 Preperation of ribosomes and their subunits from E.coli cells. Methods Enzymology, 12, 490 - 494, ed. Colowick, S.R., N.O. Kaplan, Acad.Press, New York.

TEUBER, M. 1966 Bedingungen für den Abbau von RNS in E.coli nach Zerstörung der cytoplasmatischen Membran durch Toluol. Arch.Mikrobiol. 55, 31 - 45.

TISSIÈRES, A.
WATSON, J.D.
SCHLESSINGER, D.
HOLLINGWORTH, B.R. 1959 Ribonucleoprotein particles from E.coli. J.Mol.Biol. 1, 221 - 233.

UCHIDA, T. 1966a Purification and properties of RNase T_2 J.Biochem., Tokyo, 60, 115 - 132.

UCHIDA, T. 1966b RNase T_2 from Takadieastase In: Procedures in nucleic acid research, 46 - 55, ed. by Cantoni, G.L. and D.R. Davies, New York, Harper and Row, Publ.

VALENTINE, R.C.
SHAPIRO, B.M.
STADTMANN, E.R. 1968 Regulation of glutamine synthetase XII. Electron microscopy of the enzyme from Escherichia coli. Biochem. 7, 2143 - 2152.

VENKOV, P.
SCHLESSINGER, D.
LONGO, D.
1971 Inhibition of RNase II of E.coli by sodium iones, Ado-5-TP and Transfer RNA.
J.Bacteriol. 108, 601 - 603.

WADE, H.E.
LOVETT, S.
1961 Polynucleotide phosphorylase in ribosomes from E.coli.
Biochem.J. 81, 319 - 328.

WADE, H.E.
ROBINSON, H.K.
1966 Magnesium ion-independent RNA Depolymerases in bacteria.
Biochem.J. 101, 467 - 479.

WARBURG, O.
CHRISTIAN, W.
1941 Isolierung und Charakterisation des Gärungsfermenters Enolase.
Biochem.Z. 310, 348 - 421.

WASLIEN, C.I.
CALLOWAY, D.H.
MARGEN, S.
1969 Human intolerance to bacteria as food.
Nature, 221, 84 - 85.

WEISSBACH, A.
KORN, D.
1963 The deoxyribonucleases of E.coli K 12 λ.
J.Biol.Chem. 238, 3383 - 3389.

WILDE, E.
1962 Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von Hydrogenomonas.
Arch.Mikrobiol. 43, 109 - 137.

YAMASAKI, M.
ARIMA, K.
1967 Regulation of intracellular RNase of Bacillus subtilis by ATP and ADP.
Biochim.Biophys.Acta 139, 202 - 204.

YAMASAKI, M.
ARIMA, K.
1969 Intracellular RNase of Bacillus subtilis; specific inhibition by ATP and d ATP.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 37, 430 - 436.

YAMASAKI, M.
YOSHIDA, K.
ARIMA, K.
1970 ATP-inhibited RNase of Bacillus subtilis. I. Purification and general properties.
Biochim.Biophys.Acta 209, 463 - 474.

YAMASAKI, M.
ARIMA, K.
1970 ATP-inhibited RNase of Bacillus subtilis. II. Effect of ATP and other compounds.
Biochim.Biophys.Acta 209, 475 - 483.

ZAMENHOF, S.
CHARGAFF, E.
1949 Studies on the desoxypentose nuclease of yeast and its specific cellular regulation.
J.Biol.Chem. 180, 727 - 740.

ANHANG

1. Methoden zur RNS- und DNS-Bestimmung bei Hydrogenomonas eutropha Stamm PHB$^-$4 und H16 Wildtyp

Zur routinemäßigen Durchführung von RNS- und DNS-Bestimmungen bei den beiden Stämmen wurden einige Versuche zur Sicherung der Methoden durchgeführt.

1.1. Aufstellung von Eichkurven mit reinen RNS- und DNS-Präparaten

1.1.1. Eichkurve mit reinem RNS-Präparat

Zur Herstellung von RNS-Standardlösung wurden 50 mg Hefe-RNS in 100 ml einer 0,5 N $HClO_4$-Lösung auf 100 ml gefüllt. Die so erhaltene RNS-Standardlösung enthielt eine Endkonzentration von 0,5 mg RNS/ml einer 0,5 N $HClO_4$-Lösung.

Aus dieser RNS-Lösung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt; in den einzelnen Proben wurde dann die RNS-Bestimmung nach der Methode von HERBERT et al. (1971) durchgeführt. Die gemessenen Werte der Extinktion bei 672 nm wurden gegen mg RNS/ml Standardlösung/Ansatz (Ges. Vol. = 15 ml) aufgetragen (Abbildung 1a).

Es ergab sich ein linearer Kurvenverlauf bis zu einer Konzentration von 300 µg RNS/ml Probe/Ansatz (15 ml). Aus dem Bereich der Linearität der Kurve wurden für die verschiedenen Proben die entsprechenden Gehaltswerte abgelesen und ausgerechnet.

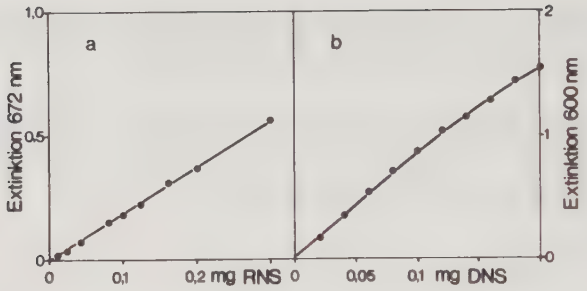


Abb. 1: Eichkurve mit reinen RNS- und DNS-Präparaten:

a. Eichkurve mit RNS aus Hefe.
Die gemessenen Extinktionswerte bei 672 nm wurden gegen mg RNS/Ansatz aufgetragen. Jeder Ansatz (15 ml) besteht aus 1 ml RNS Standardlösung (verschiedener Konzentration), 3 ml Orcin-Reagenz und nach dem Kochen (20 min) mit n-Butanol auf 15 ml aufgefüllt. Bestimmungsmethode siehe 4.1. A.b.

b. Eichkurve mit DNS aus Kalbsthymus.
Die gemessenen Extinktionswerte bei 600 nm wurden gegen die verschiedenen DNS-Konzentrationen (mg DNS je 3 ml Ansatz) aufgetragen. Die Reaktionsmischung sowie die Bestimmungsmethode wurden wie bei Methode 4.1. (B) angegeben durchgeführt.

1.1.2. Eichkurve mit DNS-Präparat

Zur Herstellung von DNS-Standardlösung wurden 40 mg DNS (aus Kalbthymus; FLUKA AG) in 100 ml 0,005 N NaOH aufgelöst (kann bei 4°C 6 Monate lang stabil bleiben). Am gleichen Tag der Probenzusammensetzung wird ein Volumen dieser DNS-Lösung (0,4 mg/ml) mit einem Volumen einer 1 N HCl O_4-Lösung gemischt und für 15 min bei 70°C erwärmt (DNS-Standardlösung besaß somit eine Endkonzentration von 0,2 mg/ml einer 0,5 N HCl O_4-Lösung).

Aus dieser DNS-Lösung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, die DNS-Bestimmung wurde in den einzelnen Proben nach der BURTON-Methode (1956) durchgeführt. Die gemessenen Werte der Extinktion bei 600 nm wurden dann gegen mg DNS/ml Standardlösung/Ansatz (Ges. Vol. von 3 ml) aufgetragen (Abbildung 1b).

Hierbei ergab sich ein linearer Kurvenverlauf bis zu einer Konzentration von 100 - 120 µg DNS/Ansatz, danach war eine Linearität nicht mehr gegeben. Aus dem linearen Bereich wurden die Werte für die verschiedenen Proben abgelesen und ausgewertet.

1.2. Optimierung der Zeit des Kochens bei der RNS-Orcin-Reaktion

Es sind mehrere Proben mit gleicher Zusammensetzung vorbereitet worden. Sie wurden in ein siedendes Wasserbad gestellt und nach 10, 15, 20, 25 und 30 min Kochen entfernt, gekühlt und wie in Methoden schon angegeben weiter verarbeitet. Die Meßwerte ergaben, wie in Abbildung 2 dargestellt, daß die optimale Zeitdauer des Kochens 20 min beträgt; diese Ergebnisse stimmten somit mit denen von HERBERT et al. (1971) zitierten Ergebnissen überein.

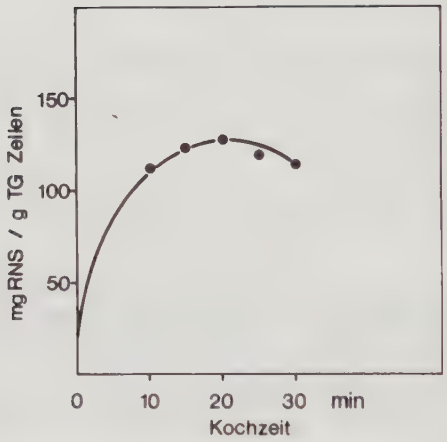


Abb. 2: Optimierung der Zeit des Kochens bei der RNS-Orcin-Reaktion. Gleiche Ansätze, die RNS-Lösung aus H16-Zellen enthalten, wurden 10, 15, 20, 25 und 30 min Kochzeit bei 100°C ausgesetzt. Die gemessenen Extinktionswerte bei 672 nm wurden in mg RNS/g Trockengewicht ausgewertet und gegen die Kochzeit aufgetragen.

1.3. Prüfung der Stabilität des gebildeten Farbkomplexes

Anhand der Meßwerte der Extinktion (Ext. 600 nm) des gebildeten Farbkomplexes wurde ermittelt, daß bei gleichen Reaktionsansätzen in der Zeit zwischen 16 und 20 Std. Inkubation (bei 30°C) keine Veränderung bezüglich der Extinktionswerte eingetreten ist (Tabelle 1).

Tab. 1: Veränderung der Extinktionswerte während der DNS-DPA-Inkubation

Inkubationszeit (Std.) bei 30°C	Ext. 600 nm	mg DNS je ml[1)]	Bemerkungen
nach 16	0,61	6,4	
17	0,61	6,4	1) 1 ml NS-Extrakt je Reaktionsansatz
18	0,61	6,4	
19	0,60	6,3	
20	0,61	6,4	

1.4. Prüfung der Effektivität der Extraktionsmethode von Nukleinsäuren aus Hydrogenomonas-Zellen

Hier wurde der Gehalt an RNS- bzw. DNS-Resten, die nach dem NS-Extrahieren (s. Methode 4.2.) in den Zellen zurückgeblieben sein könnten, bestimmt. Dabei ergab sich, daß mehr als 99% der RNS- und 98% des DNS-Gehaltes aus den Zellen bereits extrahiert wurden.

$$\text{RNS-Reste} = 0{,}7 - 1 \text{ mg} \; \begin{matrix} /\, 130 \text{ mg RNS} \\ /\, \text{im NS-Extrakt} \end{matrix} \; \begin{matrix} / \text{ g TG} \\ / \text{ Zellen} \end{matrix}$$

$$\text{DNS-Reste} = 1{,}5 - 2 \text{ mg} \; \begin{matrix} /\, 50 - 55 \text{ mg} \\ /\, \text{DNS im NS-Extrakt} \end{matrix} \; \begin{matrix} / \text{ g TG} \\ / \text{ Zellen} \end{matrix}$$

Diese Ergebnisse stehen somit im Einklang mit denen, die schon von HERBERT et al. (1971) beschrieben worden sind. Damit ist diese Methode zum NS-Extrahieren von Hydrogenomonas-Zellen ebenfalls gut geeignet.

2. Eichkurve-Herstellung mit Rinderserumalbumin

2.1. Eichkurve zur Proteingehalt-Bestimmung in ganzen Zellen; Biuret-Methode nach SCHMIDT et al. (1963)

Hierzu wurde eine Standardlösung mit 1 mg Protein je ml angewandt. Davon wurde eine Probenreihenfolge in den Konzentrationsbereich zwischen 0,5 mg und 3 mg je Ansatzprobe (6 ml) vorbereitet. Die Bestimmungsmethode wurde wie vorher angegeben durchgeführt. Die erhaltenen Meßwerte (Ext. 546 nm) wurden gegen die Proteinkonzentration (mg/6ml Ansatzprobe) graphisch dargestellt (Abbildung 3a). Aus dem Bereich der Linearität der erhaltenen Kurve wurde der entsprechende Proteingehalt für die verschiedenen Proben (Zellsuspension) abgelesen und ausgewertet.

2.2. Eichkurve zur Proteinbestimmung in zellfreien Extrakten; Biuret-Methode nach BEISENHERZ et al. (1953)

Auch hier wurde eine Standardlösung aber mit 5 mg Protein je ml angewandt. Eine Verdünnungsreihe in dem Konzentrationsbereich zwischen 0,2 und 2,5 mg Protein je Ansatzprobe (10 ml) wurde daraus vorbereitet. Die Durchführung der Bestimmungsmethode ist schon beschrieben worden (Methode 5.2.). Wie in Abbildung 3b dargestellt, ergab die Auftragung der Meßwerte (Ext. 546 nm) gegen die Proteinkonzentration (mg je 10 ml Ansatzprobe einen linearen Kurvenverlauf. Im Bereich der Linearität der erhaltenen Kurve wurde zur routinemäßigen Pro-

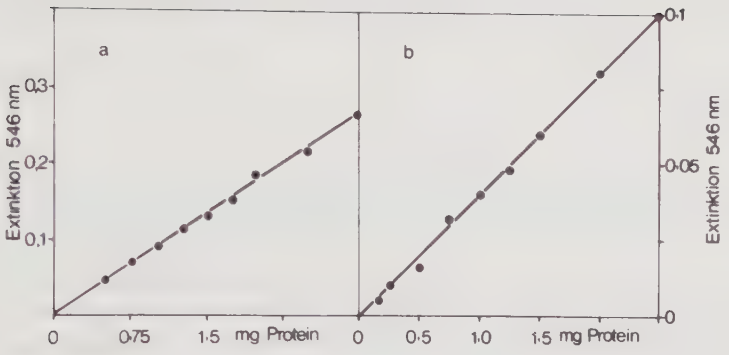


Abb. 3: Eichkurven mit Rinderserumalbumin.

a. Einkurve zur Proteinbestimmung in ganzen Zellen (nach SCHMIDT et al., 1963). Die Bestimmungsmethode bzw. die Reaktionsmischung wurden,wie bereits unter Methode 5.1. angegeben, durchgeführt. Die erhaltenen Extinktionswerte (E. 546 nm) wurden gegen die Proteinkonzentration (mg Protein je 6 ml Reaktionsmischung) aufgetragen.

b. Eichkurve zur Proteinbestimmung in zellfreien Extrakten (nach BEISENHERZ et al., 1953). Die Reaktionsmischung bzw. die Bestimmungsmethode wurden, wie unter Methode 5.2. beschrieben, ausgeführt. Die gemessenen Extinktionswerte (E. 546 nm) wurden gegen mg Protein je 10 ml Reaktionsmischung aufgetragen.

teingehaltbestimmung in Rohextrakten jede Einheit-Extinktion (bei 546 nm) entsprechend einem Proteingehalt von 25 mg je 10 ml Ansatzprobe ausgewertet.

3. Vergleich der RNase-Aktivität bei Frischzellen, gefrorenen und lyophilisierten Zellen des Stammes PHB$^-$4

Autotroph gewachsene PHB$^-$4-Zellen wurden am Ende der exponentiellen Phase (Ext. 436 nm = 8) geerntet, gewaschen und in 0,1%iger NaCl-Lösung resuspendiert (ca. 5%ige Zellsuspension bezogen auf Trockengewicht). Aus dieser Zellsuspension wurden 6 Proben mit je 10 ml in Zentrifugengläser pipettiert, die dann verschiedenen Behandlungen ausgesetzt wurden. So wurden drei Proben mit Frischzellen, gefrorenen und lyophilisierten Zellen einer Hitzebehandlung ausgesetzt, die gleichen übrigen Proben blieben jedoch ohne Hitzebehandlung. Bei allen Proben erfolgte anschließend die Gewinnung der Rohextrakte wie bereits unter Methode 8 angegeben.

Mit den verschiedenen Rohextrakten wurde der enzymatische Test auf RNase-Aktivität (s. Methode 7.2.) durchgeführt. Die erhaltenen Meßwerte der RNase-Aktivität (Tabelle 2) ergaben keine Unterschiede zwischen den verschieden vorbehandelten Zellen (Frischzellen, gefrorene oder lyophilisierte). Allerdings war die spezifische Aktivität der RNase (E/mg Protein) im allgemeinen um 4- bis 5-fach höher bei hitzebehandelten Proben als die bei derselben ohne Hitzebehandlung.

Tab. 2: Vergleich der RNase-Aktivität bei Frischzellen, gefrorenen und lyophilisierten PHB^{-}4-Zellen

	RNase-Aktivität		mg Protein
	E/ml RE	E/mg Protein	je ml RE
1. Rohextrakt der Zellen mit Hitzebehandlung			
Frischzellen	3.7	53	7.0
gefrorene	3.9	52	7.5
lyophilisierte	3.6	51	7.0
2. Rohextrakt der Zellen ohne Hitzebehandlung			
Frischzellen	4.9	13	37.5
gefrorene	5.1	14	36.3
lyophilisierte	4.6	13	35.0

Lebenslauf

17.10.1944	Geboren als Sohn des Landwirts Salim Abu Ruwaida und seiner Ehefrau Fatima in Beer-Scheba (Palästina).
1950 - 1954	Besuch der Volksschule (Primary School) des Flüchtlingslagers El-Burey im Gaza-Streifen (Palästina).
1954 - 1958	Besuch der "Preparatory School" des gleichen Lagers.
1958 - 1961	Besuch der "Secondary School".
Juli 1961	Erhaltung des Reifezeugnisses (Secondary School Leaving Certificate).
1961 - 1963	Tätigkeit als Regierungsbeamter in Ägypten.
1963 - 1967	Studium der Lebensmittel-Technologie an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Assiut (Ägypten).
Juni 1967	Diplom (Bachelor of Science).
Okt.1968 - März 1969	Studium der deutschen Sprache am Goethe-Institut/Boppard am Rhein.
April - Okt. 1969	Studium der Chemie an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Hochschule (TU) Berlin.
Nov.1969 - Okt.1971	Vorbereitung für die Diplom-Agr. Ing. Prüfung (Fachrichtung Pflanzenproduktion) an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen.
Okt.1971 - Juli 1974	Anfertigung der vorliegenden Arbeit am Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.